

Konstruktion und Charakterisierung von Reportergenassays in *S. cerevisiae* und *S. pombe* zum Nachweis anaboler androgener Substanzen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der
Technischen Universität Dresden von

Dipl. Biol. Sylvi Wolf
geboren am 24. Oktober 1981 in Dresden

Eingereicht am 06. Juli 2011
Verteidigt am 18. Juni 2012

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. Günter Vollmer
(Institut für Zoologie, TU Dresden)
Dr. Oliver Zierau
(Institut für Zoologie, TU Dresden)
Dr. Kai Ostermann
(Institut für Genetik, TU Dresden)
Prof. Dr. Patrick Diel
(Institut für Kreislaufforschung und
Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln)

Gutachter:

Prof. Dr. Günter Vollmer
(Institut für Zoologie, TU Dresden)
Prof. Dr. Wilhelm Schänzer
(Institut für Biochemie, Deutsche
Sporthochschule Köln)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen als solche kenntlich gemacht.

Die unten aufgeführten Versuche wurden von folgenden Personen durchgeführt:

1. Die Urinaufarbeitung und die Untersuchung des aufgearbeiteten Urins im Sumpter Hefeassay wurden von Felicitas Rataj als studentische Hilfskraft und Antje Beyer als technische Assistentin durchgeführt.
2. Der Vektor p423GPDAR1 wurde von Felicitas Rataj im Zuge ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit konstruiert.
3. Die Transformation von *S. pombe* mit den Plasmiden pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP, die darauf folgende Analyse der Fluoreszenz und die Bestimmung der Kultivierungsbedingungen für den konstruierten *S. pombe* Assay wurden von Felicitas Rataj als studentische Hilfskraft durchgeführt.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen sowie materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

*"Leistungssport ist das größte biologische
Experiment der Menschheitsgeschichte."*

Wildor Hollman (dt. Sportmediziner)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die die Durchführung dieser Arbeit möglich gemacht haben und mich dabei tatkräftig unterstützten.

Vielen Dank Prof. Dr. Günter Vollmer für die verständnisvolle und kompetente Betreuung.

Vor allem möchte ich Dr. Oliver Zierau, Prof. Dr. Patrick Diel, Prof. Dr. Gerhard Rödel und Dr. Kai Ostermann danken, die die Finanzierung für dieses Projekt eingeworben, mir dieses sehr interessante und anwendungsbezogene Thema anvertraut und mich dabei unterstützt haben. Dabei stand mir vor allem Dr. Oliver Zierau bei allen allgemeinen und Dr. Kai Ostermann bei genetischen Fragen hilfreich zur Seite.

Vielen Dank außerdem an Annett Groß und Uta Gey vom Institut für Genetik, die mich neben Dr. Kai Ostermann bei genetischen Fragen unterstützt haben.

Danken möchte ich auch Dr. Maria Kristina Parr und Prof. Wilhelm Schänzer vom Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln für die Bereitstellung von Urinproben und -daten, bei der Hilfe mit chemischen Problemen und der Arbeit an den Journalartikeln.

Dr. Jannette Wober und Dr. Georg Kretzschmar möchte ich für die Unterstützung im wissenschaftlichen Bereich und vor allem Dr. Jannette Wober für die umfangreiche Betreuung meines zweiten Projektes danken.

Mein Dank gilt außerdem Antje Beyer und Susanne Kolba, die bei Bestellungen, praktischen Fragestellungen und allen anderen Laborangelegenheiten immer sehr hilfreich waren.

Ein liebes Dankeschön auch an Anja Bliedtner, Dr. Frank Möller, Manuela Bader, Dr. Dina Amer und Annkathrin Keiler für die geduldige Beantwortung aller meiner mehr oder weniger sinnvollen Fragen, die Zerstreuung in den Arbeitspausen und die freundschaftliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe.

Ganz besonderer Dank gilt Felicitas Rataj, die mich als studentische Hilfskraft vor allem in der Elternzeit sehr unterstützt hat.

Katrin Richter gilt mein Dank für die Erledigung der vielen bürokratischen Dinge ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die Finanzierung meiner Arbeit möchte ich mich außerdem bei der Welt Anti-Doping Agentur, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und der TU Dresden bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XII
Zusammenfassung.....	XIII
 1 Einleitung	 1
1.1 Das endokrine System.....	1
1.2 Steroidhormone	1
1.3 Androgene.....	4
1.4 Antiandrogene	5
1.5 Endokrine Disruptoren und nicht-endogene Liganden	6
1.6 Selektive Androgen Rezeptor Modulatoren (SARMs).....	8
1.7 Doping	9
1.7.1 Geschichte des Dopings	9
1.7.2 Anabole androgene Substanzen im Doping	10
1.7.3 Nebenwirkungen anaboler androgener Steroide.....	11
1.7.4 Zusammenhang von Struktur und Stabilität anaboler androgener Steroide	12
1.7.5 Anabole androgene Steroide im Urin	13
1.7.6 Einige wichtige dopingrelevante synthetische anabole androgene Steroide	13
1.7.6.1 Boldenon.....	13
1.7.6.2 Mesterolone	14
1.7.6.3 Metandienon	14
1.7.6.4 Metenolon	15
1.7.6.5 Methyltestosteron	15
1.7.6.6 Nandrolon	16
1.7.6.7 Oxandrolon	17
1.7.6.8 Stanozolol	17
1.7.7 Designer-Steroide	18
1.7.8 Einnahme anaboler Substanzen im Freizeitsport.....	19

1.7.9	Doping im Tiersport	19
1.8	Hormonpräparate zur Wachstumsförderung in der Nahrungsmittelproduktion.....	20
1.9	Nachweisverfahren von endokrin wirksamen Steroiden	20
1.10	Hefeassays zum Nachweis endokrin wirksamer Substanzen	21
1.11	Hefe als Modellorganismus	23
1.12	Zielstellung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	PCR-Primer	26
2.1.2	Sequenzierprimer	27
2.1.3	Getestete Substanzen	28
2.1.4	Kultivierungsmedien	31
2.1.4.1	Kultivierung von <i>Escherichia (E.) coli</i>	31
2.1.4.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.1.4.3	Kultivierung von <i>S. pombe</i>	35
2.1.5	Stämme	37
2.1.5.1	<i>E. coli</i> Stämme	37
2.1.5.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	37
2.1.5.3	<i>S. pombe</i> Stämme	37
2.1.6	Plasmide	38
2.1.6.1	p416ADH (Mumberg et al., 1995)	38
2.1.6.2	p426ADH (Mumberg et al., 1995)	39
2.1.6.3	p416ADH-EGFP	39
2.1.6.4	p423GPD (Mumberg et al., 1995)	40
2.1.6.5	pSGhAR	41
2.1.6.6	pJR1-3XL (Moreno et al., 2000)	41
2.1.6.7	pJR1-3XU (Moreno et al., 2000)	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Zellkulturtechniken	42
2.2.1.1	Kultivierung von Zellen	42
2.2.1.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	42
2.2.1.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	42

2.2.1.1.3	Kultivierung von <i>S. pombe</i>	42
2.2.1.2	Bestimmung der Optischen Dichte (OD) von <i>S. cerevisiae</i>	42
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl von <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	43
2.2.1.4	Kryokonservierung	43
2.2.1.4.1	Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	43
2.2.1.4.2	Kryokonservierung von <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.1.4.3	Kryokonservierung von <i>S. pombe</i>	43
2.2.2	DNA-Methoden	44
2.2.2.1	DNA-Isolierung	44
2.2.2.1.1	Plasmid-Mini-Isolierung aus <i>E. coli</i>	44
2.2.2.1.2	Plasmid-Midi-Isolierung aus <i>E. coli</i>	44
2.2.2.1.3	Mini-Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	44
2.2.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	45
2.2.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	46
2.2.2.3	Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR.....	46
2.2.2.4	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	48
2.2.2.5	Generierung stumpfer DNA-Enden.....	49
2.2.2.6	Dephosphorylierung von geschnittenen Plasmiden.....	49
2.2.2.7	Aufreinigung von DNA	50
2.2.2.7.1	DNA-Aufreinigung mit dem Gel Extraction Kit von PeqLab.....	50
2.2.2.7.2	DNA-Aufreinigung mit Natriumacetatfällung	50
2.2.2.8	Agarose-Gel-Elektrophorese	50
2.2.2.9	DNA-Extraktion aus Agarose Gelen	51
2.2.2.10	Ligation.....	51
2.2.2.11	Transformation	52
2.2.2.11.1	Transformation von <i>E. coli</i>	52
2.2.2.11.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	53
2.2.2.12	DNA-Sequenzierung	54
2.2.2.13	Klonierung	54
2.2.3	Protein-Methoden	55
2.2.3.1	Proteinextraktion aus Hefezellen mit Y-PER.....	55
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
2.2.3.3	Western Blot.....	58
2.2.3.4	Immunfärbung	58

2.2.4	Urinaufarbeitung.....	60
2.2.4.1	Etherextraktion von Urinproben.....	60
2.2.4.2	Urinreinigung mit Säulen	60
2.2.5	Reporter-Gen Assays in der Hefe.....	61
2.2.5.1	Hefeassay mit den Sumpter <i>lacZ</i> -Hefestämmen	61
2.2.5.2	Hefeassay mit den EGFP <i>S. cerevisiae</i> oder <i>S. pombe</i> Hefestämmen.....	61
2.2.5.3	Bestimmung des EC50 Wertes	62
2.2.6	Ausscheidungsversuche.....	62
2.2.6.1	Trenbolox-Ausscheidungsversuch	62
2.2.6.2	Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch	63
2.2.6.3	1-Androsteron- Ausscheidungsversuch.....	63
3	Ergebnisse	64
3.1	<i>Charakterisierung und genetische Veränderung des Sumpter Hefeassays</i>	64
3.1.1	Hefeassays mit dem original Sumpter Stamm.....	64
3.1.1.1	Dopingsubstanzen und deren Metabolite im Sumpter Hefeassay	64
3.1.1.2	Nicht-androgene Steroide und DHEA im Sumpter Hefeassay.....	66
3.1.1.3	Urinproben von Frauen und Männern im Sumpter Hefeassay	67
3.1.1.4	Trenbolox-Ausscheidungsversuch im Sumpter Hefeassay	69
3.1.1.5	Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch	70
3.1.1.6	Effekte der Urinaufarbeitung im Sumpter Hefeassay.....	71
3.1.1.7	Antiandrogene und Naringeninderivate im Sumpter Hefeassay	73
3.1.1.8	SARMs im Sumpter Hefeassay	74
3.1.1.9	EC50 der getesteten Substanzen im Sumpter Hefeassay	75
3.1.2	Charakterisierung des Sumpter Plasmids	75
3.1.3	Klonierung des PGK-Promoters, <i>EGFP</i> und <i>lacZ</i> in den Sumpter Hefen	78
3.1.3.1	Amplifikation und Restriktion des PGK-Promoters, <i>EGFP</i> und <i>lacZ</i>	78
3.1.3.2	Klonierung in p416ADH und p426ADH	78
3.1.3.3	Klonierung in das Sumpter Plasmid	79
3.1.4	Generierung plasmidfreier Sumpter Hefen.....	80
3.1.5	Generierung und Charakterisierung der genetisch veränderten Sumpter Hefen ..	80
3.2	<i>Konstruktion eines S. cerevisiae Assays im Hefestamm BY4741</i>	84
3.2.1	Klonierung	84
3.2.2	Bestimmung der Kultivierungsbedingungen	86

3.3	<i>Konstruktion eines S. pombe Assays</i>	88
3.3.1	Klonierung	88
3.3.2	Bestimmung der Kultivierungsbedingungen	90
3.4	<i>Hefeassays mit den konstruierten S. cerevisiae und S. pombe Stämmen</i>	92
3.4.1	DHT in den konstruierten Hefeassays	92
3.4.2	Dopingsubstanzen in den konstruierten Hefeassays.....	93
3.4.3	DHT in Sammelurin in den konstruierten Hefeassays	94
3.4.4	Trenbolox-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays.....	96
3.4.5	Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays	97
3.4.6	1-Androsteron-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays.....	100
3.4.7	Antiandrogene und Naringeninderivate in den konstruierten Hefeassays.....	103
3.4.8	SARMs in den konstruierten Hefeassays	105
3.4.9	EC50 der getesteten Substanzen in den konstruierten Hefeassays.....	106
4	Diskussion.....	107
4.1	<i>Charakterisierung und genetische Veränderung des Sumpter Hefeassays</i>	107
4.1.1	Hefeassays mit dem original Sumpter Stamm.....	107
4.1.1.1	Dopingsubstanzen und deren Metabolite im Sumpter Hefeassay	108
4.1.1.2	Nicht-androgene Steroide und DHEA im Sumpter Hefeassay.....	108
4.1.1.3	Urinproben von Frauen und Männern im Sumpter Hefeassay	109
4.1.1.4	Trenbolox-Ausscheidungsversuch im Sumpter Hefeassay	110
4.1.1.5	Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im Sumpter Hefeassay	111
4.1.1.6	Effekte der Urinaufarbeitung im Sumpter Hefeassay.....	112
4.1.1.7	Antiandrogene, Naringeninderivate und SARMs im Sumpter Hefeassay .	113
4.1.2	Charakterisierung des Sumpter Plasmids	115
4.1.3	Klonierung des PGK-Promoters, <i>EGFP</i> und <i>lacZ</i> in den Sumpter Hefen	116
4.1.4	Generierung plasmidfreier Sumpter Hefen.....	116
4.1.5	Charakterisierung der genetisch veränderten Sumpter Hefen	117
4.2	<i>Konstruktion und Charakterisierung des BY4741 S. cerevisiae Hefeassays</i>	118
4.2.1	Klonierung	118
4.2.2	Bestimmung der Kultivierungsbedingungen	119
4.3	<i>Konstruktion und Charakterisierung des KO110 S. pombe Hefeassays</i>	120
4.3.1	Klonierung	121
4.3.2	Bestimmung der Kultivierungsbedingungen	122

4.4	<i>Vergleich der konstruierten Hefeassays</i>	123
4.4.1	DHT in den konstruierten Hefeassays	123
4.4.2	Dopingsubstanzen in den konstruierten Hefeassays.....	123
4.4.3	DHT in Sammelurin in den konstruierten Hefeassays	125
4.4.4	Trenbolox-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays.....	126
4.4.5	Methyltestosteron -Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays	127
4.4.6	1-Androsteron -Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays	128
4.4.7	Antiandrogene und Naringenine in den konstruierten Hefeassays.....	130
4.4.8	SARMs in den konstruierten Hefeassays	131
5	Schlussfolgerung und Ausblick	133
6	Literaturverzeichnis	136
7	Anhang	144

Abkürzungsverzeichnis

6-DMAN	6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin
8-PN	8-Prenylnaringenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CPRG	Chlorophenolrot- β -D-galactopyranosid
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxy Nukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	optimiertes (<i>enhanced</i>) grün fluoreszierendes Protein
EtBr	Etidium-Bromid
GC	Gaschromatographie
GPD	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
HRPO	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IRMS	Isotopenverhältnis Massenspektrometrie (<i>isotope ratio mass spectrometry</i>)
kb	kilo Basen
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LHRH	Luteinisierendes Hormon <i>Releasing</i> -Hormon
LiAc	Lithiumacetat
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie

NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	Phosphat-gepufferte Saline mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen	Penicillin
PGK	Phosphoglyceratkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SARM	Selektiver Androgen Rezeptor Modulator
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Strep	Streptomycin
Upm	Umdrehungen pro Minute
WADA	Welt Anti Doping Agentur
YAS	<i>yeast androgen screen</i>
YES	<i>yeast estrogen screen</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Steran als Grundgerüst der Steroide	1
Abbildung 1.2 Graphische Darstellung der Biosynthese von Steroidhormonen.....	2
Abbildung 1.3 Struktur von Androstan	4
Abbildung 1.4 Struktur von Testosteron und Dihydrotestosteron	4
Abbildung 1.5 Struktur von Bicalutamid, Flutamid und Nilutamid.....	5
Abbildung 1.6 Struktur von 8-Prenylnaringenin und 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin	7
Abbildung 1.7 Struktur von SARM 4-F und SARM S4	8
Abbildung 1.8 Testosteron Steroidgerüst und seine häufigsten chemischen Modifikationen	12
Abbildung 1.9 Struktur von Boldenon	13
Abbildung 1.10 Struktur von Mesterolone.....	14
Abbildung 1.11 Struktur von Metandienon.....	14
Abbildung 1.12 Struktur von Metenolon	15
Abbildung 1.13 Struktur von Methyltestosteron	15
Abbildung 1.14 Struktur von Nandrolon.....	16
Abbildung 1.15 Struktur von Oxandolon	17
Abbildung 1.16 Struktur von Stanozolol.....	17
Abbildung 1.17 Struktur von 17 β -hydroxy-estra-4,9,11-trien-3-on und Estra-4,9-diene-3,17- dion	18
Abbildung 1.18 Struktur von 1-Androsteron	19
Abbildung 1.19 Schematische Darstellung des <i>yeast androgen screen</i>	23
Abbildung 2.1 Plasmidkarte des Vektors p416 ADH	38
Abbildung 2.2 Plasmidkarte des Vektors p426ADH	39
Abbildung 2.3 Plasmidkarte des Vektors p423GPD	40
Abbildung 2.4 Plasmidkarte des Vektors pSG5hAR	41
Abbildung 3.1 Konzentrations-Wirkungskurven von Dopingsubstanzen und deren Metabolite im Sumpter Hefeassay	66
Abbildung 3.3 Konzentrations-Wirkungskurven von Urinproben schwangerer Frauen, Frauen und Männern im Sumpter Hefeassay.....	68
Abbildung 3.4 Konzentrations-Wirkungskurven des Trenbolox-Ausscheidungsversuchs im Sumpter Hefeassay	69
Abbildung 3.5 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im Sumpter Assay	70

Abbildung 3.6 Konzentrations-Wirkungskurven von Sammelurin von Männern nach Urinaufarbeitung im Sumpter Hefeassay	72
Abbildung 3.7 Konzentrations-Wirkungskurven von Antiandrogenen im Sumpter Hefeassay	73
Abbildung 3.8 Konzentrations-Wirkungskurven von SARMs im Sumpter Hefeassay	74
Abbildung 3.9 Gelelektrophoresegele der Restriktionsanalyse des Sumpter-Plasmids.....	76
Abbildung 3.10 Nukleobasensequenz des Hefe <i>PGK1</i> Promoters.....	76
Abbildung 3.11 Nukleobasensequenz des PGK-Promoters im Sumpter Plasmid	77
Abbildung 3.12 Lage der <i>Bam</i> HI Restriktionsschnittstellen im Sumpter Plasmid	79
Abbildung 3.13 Absorptionsmessung des original Sumpter Stammes mit DHT	81
Abbildung 3.14 Absorptionsmessung des Sumpter Stammes mit dem original Sumpter Plasmid mit DHT.....	81
Abbildung 3.15 Absorptionsmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p416PGKlacZ mit DHT.....	82
Abbildung 3.16 Absorptionsmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p426PGKlacZ mit DHT.....	82
Abbildung 3.17 Fluoreszenzmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid pSumpterEGFP mit DHT	83
Abbildung 3.18 Fluoreszenzmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p416PGKEGFP mit DHT.....	83
Abbildung 3.19 Fluoreszenzmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p426PGKEGFP mit DHT.....	84
Abbildung 3.20 Immunologischer Nachweis des Androgenrezeptors im konstruieren <i>S. cerevisiae</i> Assay	85
Abbildung 3.21 Test verschiedener DHT-Konzentrationen und Zellzahlen im konstruierten <i>S. cerevisiae</i> Assay	86
Abbildung 3.22 Fluoreszenz und Trübung des konstruierten <i>S. cerevisiae</i> Assays.....	87
Abbildung 3.23 Immunologischer Nachweis des Androgenrezeptors im konstruieren <i>S. pombe</i> Assay.....	89
Abbildung 3.24 Test verschiedener DHT-Konzentrationen und Zellzahlen im konstruierten <i>S. pombe</i> Assay.....	90
Abbildung 3.25 Fluoreszenz und Trübung des konstruierten <i>S. pombe</i> Assays	91
Abbildung 3.26 Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DHT in den konstruierten Hefeassays	92

Abbildung 3.27 Konzentrations-Wirkungskurven verschiedener Dopingsubstanzen in den konstruierten Hefeassays	93
Abbildung 3.28 Konzentrations-Wirkungskurven von 10 % oder 20 % Urin mit DHT in den konstruierten Hefeassays	94
Abbildung 3.29 Trenbolox-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays	96
Abbildung 3.30 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im konstruierten <i>S. cerevisiae</i> Assay	97
Abbildung 3.31 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im konstruierten <i>S. pombe</i> Assay	98
Abbildung 3.32 Konzentrations-Wirkungskurve von 1-Androsteron in den konstruierten Hefeassays mit 10 % Sammelurin im Hefemedium.....	100
Abbildung 3.33 1-Androsteron-Ausscheidungsversuch im <i>S. cerevisiae</i> Assay	101
Abbildung 3.34 1-Androsteron-Ausscheidungsversuch im <i>S. pombe</i> Assay	101
Abbildung 3.35 Konzentrations-Wirkungskurven verschiedener Antiandrogene in den konstruierten Hefeassays	104
Abbildung 3.36 Konzentrations-Wirkungskurven zweier SARMs in den konstruierten Hefeassays	105
Abbildung 7.1 Plasmidkarte von p416PGKlacZ.....	144
Abbildung 7.2 Plasmidkarte von p426PGKlacZ.....	144
Abbildung 7.3 Plasmidkarte von p416PGKEGFP	145
Abbildung 7.4 Plasmidkarte von p426PGKEGFP	145
Abbildung 7.5 Plasmidkarte von p423GPDAR1	146
Abbildung 7.6 Plasmidkarte von pJR1-3XLAR1.....	146
Abbildung 7.7 Plasmidkarte von pJR1-3XUEGFP	147

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Häufigkeiten von detektierten Einzelsubstanzen in der Gruppe der anabolen Stoffe (WADA, 2009)	10
Tabelle 2.1 Name und Sequenz der PCR-Primer.....	26
Tabelle 2.2 Name, Sequenz und Template der verwendeten Sequenzierprimer.	27
Tabelle 2.3 Herkunft getesteter Substanzen.....	28
Tabelle 2.4 Struktur und Herkunft getesteter Dopingsubstanzen und deren Metaboliten.....	29
Tabelle 2.5 Aminosäuren und deren Konzentrationen für das W ₀ Minimalmedium	32
Tabelle 3.1 EC ₅₀ Werte der getesteten Substanzen im Sumpter Hefeassay	75
Tabelle 3.2 Vergleich des Methyltestosteron-Ausscheidungsversuchs im Sumpter Assay, im konstruierten <i>S. cerevisiae</i> und im konstruierten <i>S. pombe</i> Assay	99
Tabelle 3.3 Vergleich des 1-Androsteron Ausscheidungsversuchs im <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i> Reporterassay	102
Tabelle 3.4 EC ₅₀ Werte der getesteten Substanzen in den konstruierten <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i> Assays	106

Zusammenfassung

Der Missbrauch anaboler Substanzen zur Leistungssteigerung wird von den meisten Sportverbänden, dem Olympischen Komitee und vor allem der Welt Anti Doping Agentur (WADA) abgelehnt und sanktioniert. Trotzdem bleibt der Missbrauch derartiger Substanzen sowohl im Leistungs- als auch im Freizeitsport nicht zuletzt aufgrund der starken Nebenwirkungen ein schwerwiegendes Problem. Allein im Leistungssport sind 2009 ca. 2 % der von der WADA durchgeführten Dopingkontrollen positiv ausgefallen. Dabei konnten in 65 % der positiv-getesteten Proben muskelaufbauende anabole Substanzen nachgewiesen werden. Im Freizeitsport konzentriert sich der Missbrauch dieser verbotenen Substanzen vor allem im Bereich des Bodybuildings.

Die einzige rechtlich relevante und routinemäßig genutzte analytische Methode für den Nachweis anaboler Steroide in Urinproben von Sportlern ist die Gas- oder Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie. Diese Methoden sind jedoch sehr kosten- und zeitintensiv. Außerdem können dabei unbekannte Substanzen nur schwer nachgewiesen werden. Ein alternativer Ansatz zum Nachweis androgener anaboler Steroide führt über deren biologische Aktivität. Auf diesem Prinzip beruhen unter anderem Hefeassays. Diese Assays sind kostengünstig, schnell und einfach durchzuführen.

In dieser Arbeit wurden zwei neue Hefeassays zum einen in der Hefe *Saccharomyces (S.) cerevisiae* und zum anderen in der Hefe *Schizosaccharomyces (S.) pombe* konstruiert und hinsichtlich ihrer Eignung zur Doping-*Prescreening* Analyse getestet. Diese zwei Hefen wurden genutzt, da sie phylogenetisch sehr weit voneinander entfernt sind und dadurch unter anderem einen unterschiedlichen Metabolismus und einen unterschiedlichen Aufbau der Zellwand besitzen. In Hefeassays können falsch negative und falsch positive Ergebnisse auftreten, da endokrin-wirksame Substanzen in der Hefe und im humanen Organismus eine unterschiedliche Wirkung besitzen können. Humane Zellen unterscheiden sich von Hefezellen unter anderem im Metabolismus von aufgenommenen Substanzen, in der Durchlässigkeit der Zellwand für verschiedene Stoffe und in Transportsystemen, die Substanzen aus der Zelle ausschleusen. Eine Kombination dieser beiden neu konstruierten Assays verspricht den Aktivitätsnachweis eines viel größeren Substanzspektrums, als es mit einem System allein möglich wäre, wodurch eine Reduzierung falsch negativer Ergebnisse erreicht werden kann.

Als erster Schritt in dieser Arbeit wurde ein bestehendes Hefesystem von Sohoni und Sumpter (1998) charakterisiert. Der Hefestamm dieses *S. cerevisiae* Reporter-gen-Assays exprimiert den humanen Androgenrezeptor (AR) konstitutiv, da das AR-Gen durch genetische

Manipulation ins Genom der Hefe stabil integriert wurde. Außerdem liegt in der Hefezelle ein so genanntes Reporterplasmid vor. Dieses Plasmid trägt das *lacZ* Gen, welches in diesem Fall als Reportergen funktioniert und unter der Kontrolle eines androgen-sensitiven Promoters steht. Gelangen nun Androgene in diese Zellen wird das *lacZ* Gen abgelesen und die β -Galactosidase gebildet. Dieses Enzym wird ins Hefemedium sekretiert und wandelt dort einen gelben in einen roten Farbstoff um. Dieser Farbumschlag kann nunmehr quantitativ gemessen und als Maß androgener Aktivität ausgewertet werden.

Die Eignung dieses Reportergenassays als Doping-*Prescreening* Test konnte in vielfältigen Experimenten bestätigt werden. Zunächst konnten mit diesem Assay bekannte Dopingsubstanzen und deren Metabolite anhand ihrer biologischen Aktivität nachgewiesen werden. Außerdem konnte die Spezifität des Assays gegenüber Androgenen gezeigt werden, wobei Steroide anderer Klassen, wie das Mineralocorticoid Aldosteron, das künstliche Glucocorticoid Dexamethason, das Östrogen 17 β -Östradiol und das Gestagen Progesteron und außerdem das Prohormon Dehydroepiandrosteron im Hefeassay geprüft worden sind. Alle diese Substanzen zeigten keinen relevanten Signalanstieg in physiologischen Konzentrationen. Weiterhin wurde die Praktikabilität des Hefeassays für die Doping-*Prescreening* Analyse anhand eines Trenbolox- und eines Methyltestosteron-Ausscheidungsversuchs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Hefen dieses Assays eine 20 %ige Urinkonzentration im Medium tolerieren und gleichzeitig die biologische Aktivität von oral eingenommenem Methyltestosteron und Estra-4,9-dien-3,17-dion (Präparatname: Trenbolox) bzw. deren Metabolite in Urinproben detektierbar ist. Außerdem wurden parallel Urinproben von Frauen und Männern, die keine androgen wirksamen Substanzen eingenommen haben, getestet. Diese Urinproben ohne exogene Zufuhr von anabolen Steroiden wiesen keinen bedeutenden Signalanstieg auf.

Eine Verbesserung des ursprünglichen Reportergenassays von Sohoni und Sumpter wurde durch den Austausch des Reportergens von *lacZ* zum optimierten grün fluoreszierenden Protein (*EGFP*) erreicht. Dadurch konnte eine deutliche Verringerung der Inkubationszeit von 48 auf 24 Stunden bewirkt werden.

Auch bei der Konstruktion der beiden neuen Reportergenassays in *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurde daraufhin *EGFP* als Reportergen eingesetzt. Dafür wurde ein für die jeweilige Hefe spezifisches Reporterplasmid mit dem *EGFP*-Gen unter der Kontrolle eines androgen-sensitiven Promoters und ein spezifisches Expressionsplasmid mit dem Gen für den humanen Androgenrezeptor konstruiert und in die jeweilige Hefe eingebracht. Durch Optimierungsversuche wurde festgestellt, dass beide neu konstruierten Hefen eine identische

einzusetzende Zellzahl, Inkubationszeit, Inkubationstemperatur und ein identisches Kulturvolumen besitzen. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass beide Assays gut kombiniert werden können.

Mit Hilfe beider Hefeassays konnte die Wirkung verschiedener dopingrelevanter Substanzen detektiert werden, wobei der *S. cerevisiae* Assay eine geringfügig höhere Sensitivität zeigte als der *S. pombe* Assay und sogar als der Reporter-genassay von Sohoni und Sumpter.

Zum weiteren Vergleich der Sensitivität beider Assays wurden drei Ausscheidungsversuche durchgeführt. Im ersten so genannten Trenbolox-Ausscheidungsversuch zeigte der *S. pombe* Assay in allen fünf Urinproben ein stärkeres Signal als die Referenzprobe. Im *S. cerevisiae* Assay konnten nur vier der fünf getesteten Urinproben eine höhere Signalintensität als die Referenzprobe erreichen. Dies lässt auf eine unterschiedliche Sensitivität beider Assays für die eingenommene Substanz Estra-4,9-dien-3,17-dion (Trenbolox) bzw. seiner Metabolite schließen. In einem zweiten Ausscheidungsversuch nach 1-Androsteron Einnahme konnte gezeigt werden, dass im Urin hohe Konzentrationen von ausgeschiedener Ausgangssubstanz oder deren Metabolite bis zu 30 Stunden nach Substanzeinnahme ein positives Signal in beiden Hefeassays hervorriefen. Wohingegen zu späteren Ausscheidungszeitpunkten beide Hefeassays sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Beide Hefen scheinen späte Metabolite von 1-Androsteron mit unterschiedlicher Sensitivität zu detektieren. Im dritten Ausscheidungsversuch mit der Substanz Methyltestosteron konnte ebenfalls eine sehr unterschiedliche Sensitivität beider konstruierter Hefeassays gegenüber Methyltestosteron und seiner Metabolite festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Ausscheidungsversuche scheinen die Annahme zu bestätigen, dass eine Kombination beider Assays den Aktivitätsnachweis eines weiten Spektrums von androgenen Substanzen gewährleistet. Vor allem in der Dopinganalyse wäre dies von großem Vorteil, um bisher unbekannte Substanzen, wie neue so genannte Designer-Steroide, in Kombination mit der MS-Analytik nachzuweisen. Die Hefeassays bieten dabei die Möglichkeit zum einfachen, schnellen und kostengünstigen Doping-*Prescreening*. Auch der hier erstmals untersuchte direkte Einsatz von unbehandelten Urinproben in Hefeassays ist ein deutlicher Vorteil im Vergleich zu den klassischen Methoden, bei denen die Urinproben aufwendig gereinigt werden müssen.

Ein weiteres aus unseren Ergebnissen resultierendes Anwendungsgebiet für die konstruierten Hefeassays könnte der Nachweis der biologischen Aktivität von Antiandrogenen sein.

1 Einleitung

1.1 Das endokrine System

Die endokrine Signalübertragung ist neben der parakrinen, der synaptischen und der neurosekretorischen Signalübertragung für die Steuerung der Körperfunktionen, die sich vom Wachstum, über die Fortpflanzung bis hin zum Verdauungsvorgang erstrecken, verantwortlich. Die durch die endokrinen Drüsen freigesetzten Hormone werden über den Blutstrom im Körper verteilt und übertragen so Informationen zwischen den Organen. Auch wenn ein bestimmtes Hormon in alle Bereiche des Körpers gelangt, können nur Zellen reagieren, die mit einem für dieses Hormon spezifischem Rezeptor ausgestattet sind. Dabei können diese Rezeptoren membranständig oder intrazellulär vorliegen. An membranständige Rezeptoren binden vor allem Peptidhormone und an intrazelluläre binden primär chemische Substanzen, die wahrscheinlich durch die Zellmembran diffundieren können, wie die lipophilen Steroidhormone (Campbell, 1998).

1.2 Steroidhormone

Die steroidale Struktur der Steroidhormone mit Steran als Grundgerüst ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Ausgangssubstanz für die biologische Synthese dieser Hormone ist Cholesterin (Stryer, 1999) (Abbildung 1.2).

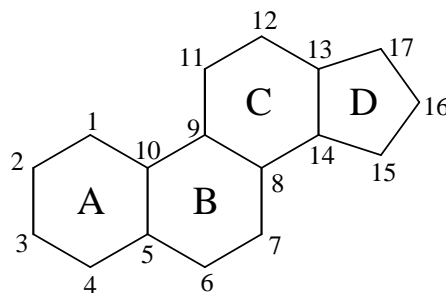


Abbildung 1.1 Steran als Grundgerüst der Steroide

Zu den Steroidhormonen gehören die Corticosteroide der Nebennierenrinde und die Sexualhormone der Keimdrüsen (Campbell, 1998). Zu den Corticosteroiden zählen die Glucocorticoide und die Mineralocorticoide. Glucocorticoide wirken hauptsächlich auf den Energiestoffwechsel. Sie unterstützen die Wirkung von Glucagon, indem sie die Synthese von Glucose aus Nicht-Kohlenhydraten fördern. Außerdem induzieren Glucocorticoide den Abbau von Muskelproteinen im Skelettmuskel für die Bildung von Glucose (Campbell, 1998). In

hohen Dosen wirken sie entzündungshemmend und werden deshalb therapeutisch zur Unterdrückung der Immunreaktion eingesetzt (Munk, 2002). Beispiele für Glucocorticoide sind Cortisol und die künstliche Substanz Dexamethason. Ein Mineralocorticoid ist zum Beispiel Aldosteron. Es reguliert den Elektrolyt- und Wasserhaushalt im Körper durch eine vermehrte Rückresorption von Natrium und Wasser in der Niere (<http://www.medizininfo.de/endokrinologie/hormone.htm>).

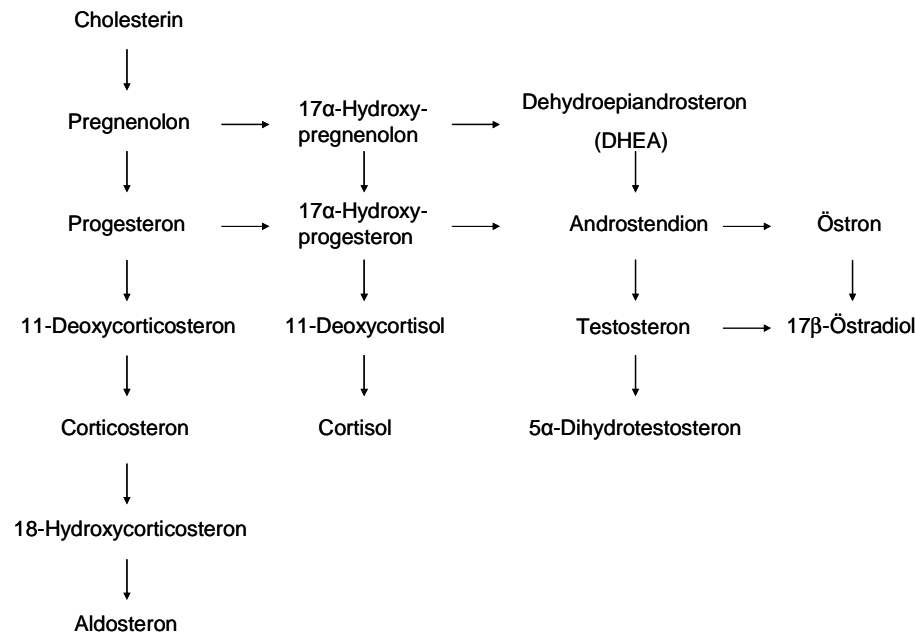


Abbildung 1.2 Graphische Darstellung der Biosynthese von Steroidhormonen

Die Sexualhormone werden in drei Gruppen eingeteilt: Östrogene, Gestagene und Androgene (Campbell, 1998). Östrogene und Gestagene werden bei Frauen hauptsächlich in den Ovarien, Follikeln und dem Gelbkörper gebildet, Androgene bei Männern hauptsächlich in den Hoden (Campbell, 1998). Östrogene sind unter anderem für die Funktionserhaltung des weiblichen Fortpflanzungssystems und der Entwicklung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich (Campbell, 1998). Natürlich vorkommende Östrogene sind Östron (E1), 17β-Östradiol (E2) und Östriol (E3), wobei der biologisch bedeutendste Vertreter 17β-Östradiol ist (Johnson, 2007). Die Hauptaufgabe von Gestagenen, zum Beispiel von Progesteron, besteht im Vorbereiten und Erhalten der Uterusschleimhaut, um das Wachstum und die Entwicklung des Embryos bzw. Fötus zu ermöglichen (Campbell, 1998). Androgene, mit dem biologisch bedeutendsten Vertreter Testosteron, fördern die Geschlechtsdifferenzierung der männlichen Fortpflanzungsorgane. Außerdem sind sie für die

Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich und sind anabol wirksam, indem sie das Knochen- und Muskelwachstum fördern (<http://www.medizinfo.de/endokrinologie/hormone.htm>).

Der grundsätzliche Wirkungsweg der Steroidhormone wird über nukleäre Rezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren haben strukturell einen ähnlichen Aufbau. N-terminal besitzen sie eine variable A/B Domäne, gefolgt von einer hochkonservierten Desoxyribonukleinsäure (DNA)-bindenden Domäne, die zwei Zinkfingerstrukturen enthält, einer Scharnierregion, die eine Krümmung des Rezeptors und damit seine Dimerbildung ermöglicht und einer variablen Ligandbindungsdomäne, die je nach Bindung eine Schalter- und Transaktivatorfunktion ausübt. C-terminal befindet sich eine variable F-Region, deren Funktion noch nicht völlig geklärt ist (Enmark und Gustafsson, 1999; Mangelsdorf et al., 1995).

Für den klassischen Wirkmechanismus der Steroidhormone wird angenommen, dass das Hormon aufgrund seiner lipophilen Struktur durch die Zellmembran diffundiert und als Ligand an seinen spezifischen Rezeptor bindet. Dadurch werden Chaperone, wie Hsp 70 und Hsp90 vom Rezeptor abgespalten. Danach kommt es meist zu einer Dimerisierung des Rezeptors. Hierbei kann es je nach Rezeptor und dessen Subtypen zu Homo- oder Heterodimeren kommen. Durch die ligandenabhängige Aktivierung des Rezeptors wird eine Konformationsänderung bewirkt, die die Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplex in den Zellkern auslöst und das Freiwerden zweier Zinkfingerstrukturen bewirkt. Im Promoterbereich von Zielgenen binden die Rezeptordimere mit den Zinkfingerstrukturen an responsive Elemente, die oft eine palindromische oder *tandem-repeat* Struktur besitzen. Dort wirken sie als Transkriptionsfaktoren. Nach Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren und gegebenenfalls der RNA-Polymerase erfolgt eine Änderung der transkriptionellen Aktivität des Zielgens. Dabei können Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren die transkriptionelle Wirkung der als Transkriptionsfaktoren wirkenden nukleären Rezeptoren erhöhen bzw. erniedrigen (Knippers, 2001; Lazar, 2002).

1.3 Androgene

Als Androgene werden natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Substanzen, die ihre androgene und/oder anabole Wirkung über die Bindung an den Androgenrezeptor vermitteln, bezeichnet. Androgene Wirkungen, wie zum Beispiel der Einfluss von Testosteron auf die Reifung der Spermien, beziehen sich auf die inneren und äußeren Geschlechtsorgane. Die anabole Wirkung wird über eine gesteigerte Proteinsynthese vermittelt, was zum Beispiel zum Muskelaufbau führt.

Androgene haben meist eine steroidale Struktur mit Androstan als Grundgerüst (Abbildung 1.3).

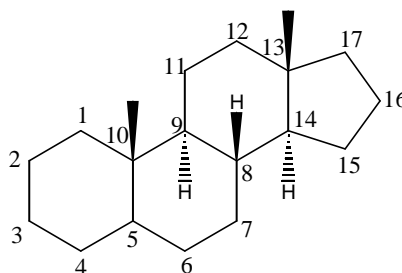


Abbildung 1.3 Struktur von Androstan (10 β ,13 β -Dimethyl-gonan)

In der Literatur ist beschrieben, dass die androgene Wirkung von Steroiden hauptsächlich durch die 17 β -Hydroxygruppe und die Carbonylgruppe oder ähnliche Substituenten an Position 3 hervorgerufen wird. Dabei unterstützt wahrscheinlich die Carbonylgruppe den androgenen Effekt, ist aber nicht essentiell und kann durch eine 2-3 Doppelbindung ersetzt werden. Auch eine 5 α -Reduktion des A-Ringes verstärkt die Androgenität. Dies ist zum Beispiel bei Dihydrotestosteron (DHT) der Fall (Abbildung 1.4 B). DHT ist das stärkste natürlich vorkommende Androgen und bindet durch die 5 α -Reduktion von Testosteron (Abbildung 1.4 A) zwei- bis zehnmal stärker an den humanen Androgenrezeptor als Testosteron (Büttner und Thieme, 2010).

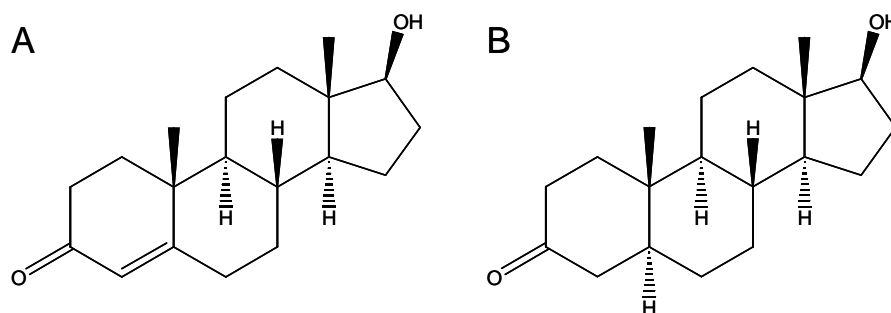


Abbildung 1.4 Struktur von Testosteron (A) und Dihydrotestosteron (B)

Vollständig oder teilweise deaktiviert werden androgene Steroide unter anderem durch eine Oxidation von 3- und 17 α/β -Hydroxygruppen mittels Hydroxysteroid-Dehydrogenasen oder eine Aromatisierung des A-Ringes durch die Aromatase, wodurch Östrogene entstehen (Büttner und Thieme, 2010).

Bei Androgenen mit Ethinylgruppe besteht ein bedeutsamer enterohepatischer Kreislauf, der die Wirkung dieser Substanzen verstärken und verlängern kann (Feige et al., 2006).

1.4 Antiandrogene

Antiandrogene konkurrieren mit Androgenen um die Bindung an den Androgenrezeptor und blockieren diesen. Dadurch wird die Expression androgen responsiver Gene verhindert. Sie werden vor allem zur Behandlung bei Prostatakrebs eingesetzt. Außerdem können sie auch bei Frauen mit übermäßigem Haarwuchs mit männlichem Verteilungsmuster der Haare (Hirsutismus) Anwendung finden (Swiglo et al., 2008). Mögliche Nebenwirkungen sind Gynäkomastie, Durchfall und Impotenz (Wirth et al., 2007). Starke Antiandrogene sind zum Beispiel Flutamid, Bicalutamid und Nilutamid (Abbildung 1.5).

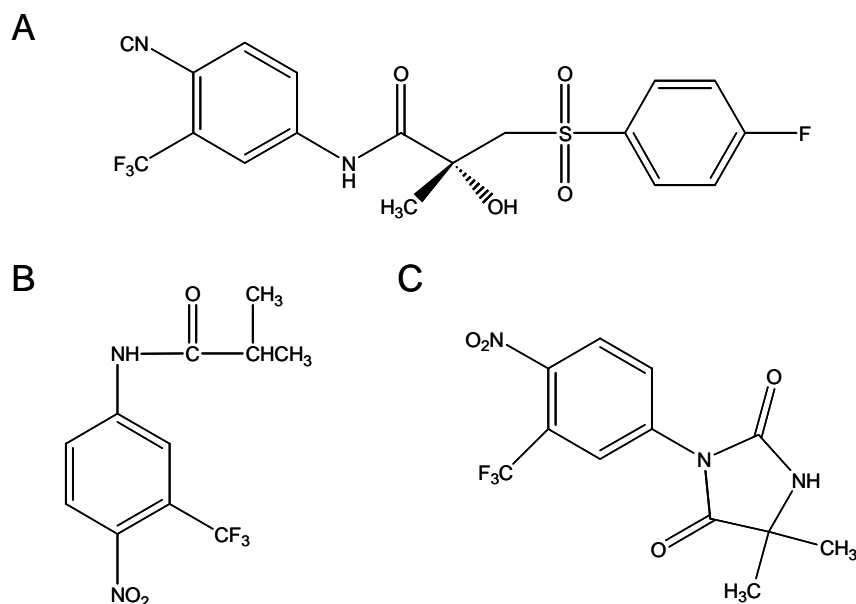


Abbildung 1.5 Struktur von Bicalutamid (A), Flutamid (B) und Nilutamid (C).

Flutamid wurde 1973 von Schering AG patentiert und ist mittlerweile als Generikum im Handel. Es ist ein oral verfügbarer nicht-steroidaler Androgenrezeptorantagonist, der vorrangig in Kombination mit Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon (LHRH) zur

Behandlung von fortgeschrittenem Prostatakrebs angewendet wird (Portal für Arzneimittelinformationen des Bundes und der Länder). Heutzutage wird Flutamid meistens durch Bicalutamid ersetzt, weil durch die Behandlung von metastasierendem Prostatakarzinom mit Bicalutamid das mittlere Überleben der Patienten verlängert wird und weniger Nebenwirkungen, wie Durchfall auftreten (Schellhammer et al., 1997). Bicalutamid wird unter anderem als Casodex[®] vermarktet, ist ein oral verfügbarer nicht-steroidaler Androgenrezeptorantagonist und wird zur Behandlung von fortgeschrittenem Prostatakarzinom mit hohem Progressionsrisiko eingesetzt (Portal für Arzneimittelinformationen des Bundes und der Länder). Nilutamid ist ebenfalls ein nicht-steroidales, oral verfügbares Antiandrogen. Es wird in den USA und in Kanada in Kombination mit chirurgischer Kastration zur Behandlung von metastasierendem Prostatakrebs verwendet (<http://products.sanofi-aventis.us/nilandron/nilandron.html>).

1.5 Endokrine Disruptoren und nicht-endogene Liganden

Ein endokriner Disruptor ist eine exogene chemische Substanz oder ein Substanzgemisch, die bzw. das die Struktur oder die Funktion des endokrinen Systems verändert und adverse Effekte auf der Ebene eines Organismus, seiner Nachkommen, von Populationen oder Unterpopulationen von Organismen, basierend auf wissenschaftlichen Prinzipien, Daten, stützenden Beweisen und dem Grundsatz der Vorsorge, hervorruft (EPA, 1998). Sie können die Synthese, die Verteilung, den Metabolismus, die Exkretion und die Wirkung von endogenen Hormonen beeinträchtigen (Toppari, 2008). In der Literatur ist beschrieben, dass männliche und weibliche Föten, die in der Schwangerschaft östrogen wirksamen exogenen Substanzen ausgesetzt waren, strukturelle und funktionelle Anomalien aufweisen können. Dahingegen führen exogen zugeführte Androgene nur in weiblichen und Antiandrogene nur in männlichen Föten zu Schäden (Toppari, 2008). Auch konnte der Einfluss endokriner Disruptoren zum Beispiel auf den Beginn der Pubertät vor allem bei Mädchen nachgewiesen werden (Mouritsen et al.). Bei Fischen (Lange et al., 2001), Amphibien (Kloas, 2002; Kloas und Lutz, 2006) und Vögeln (Waring und Harris, 2005) können sie sogar eine Verweiblichung des genetisch männlichen Nachwuchses hervorrufen. Die Zahl der in der Umwelt nachgewiesenen Antiandrogene steigt ständig. Die Substanzen zeigen eine klare dosisabhängige Wirkung mit der Gefahr, dass eine Mischung dieser Substanzen adverse Effekte zeigen können, selbst wenn die einzelnen Komponenten in sehr geringen Konzentrationen vorliegen (Toppari, 2008).

Endokrine Disruptoren werden hauptsächlich über die Nahrung, aber auch über die Atemluft oder die Haut aufgenommen (Toppari, 2008). Synthetisch hergestellte endokrine Disruptoren sind zum Beispiel bestimmte Weichmacher in Kunststoffen, wie das östrogen wirksame Bisphenol A, Detergentien, haltbarmachende Zusätze in Lebensmitteln oder auch Komponenten von Schutzfarben (Tributyl-Zinn, ein Aromatase-Inhibitor) (Müller und Hassel, 2002). Aber auch natürlich vorkommende Substanzen, wie einige Flavonoide, können störend in das endokrine System eingreifen (Waring und Harris, 2005) und könnten somit zu den endokrinen Disruptoren gezählt werden. Zu den Flavonoiden gehört auch Naringenin. Naringeninderivate sind zum Beispiel 8-Prenylnaringenin (8-PN) und 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin (6-DMAN) (Abbildung 1.6).

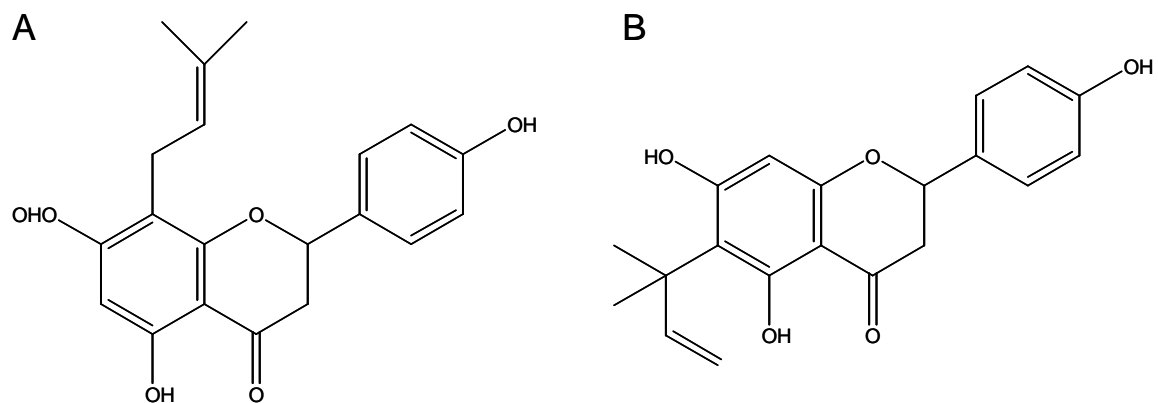


Abbildung 1.6 Struktur von 8-Prenylnaringenin (A) und 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin (B).

8-PN stammt aus dem Hopfen *Humulus lupulus* (L.) und weist östrogene, als auch schwach antiandrogene Eigenschaften auf. In der Literatur wurde diskutiert, ob 8-PN für Störungen im Menstruationszyklus bei weiblichen Hopfenarbeitern verantwortlich ist. Da die Hopfenernte heutzutage jedoch maschinell von statten geht, führt für die meisten Menschen der einzige Weg der Aufnahme für 8-PN über den Konsum von Bier. Für die im Bier vorliegenden Konzentrationen von 8-PN konnten allerdings keine adversen Effekte nachgewiesen werden (Milligan et al., 1999). Somit ist fraglich, ob 8-PN zu den endokrinen Disruptoren gezählt werden kann. Es ist aber ein nicht-endogener Ligand der Östrogenrezeptoren α und β (Roelens et al., 2006). 6-DMAN kommt in den Blättern des afrikanischen Baumes *Monotes engleri* (Gilg.) vor und hat östrogene und antiandrogene Eigenschaften (Zierau et al., 2008). Es zeigte nur schwache toxische Effekte in Konzentrationen unter 50 μ M (Tokalov et al., 2004) und kann dementsprechend bisher nicht den endokrinen Disruptoren zugeordnet werden.

1.6 Selektive Androgen Rezeptor Modulatoren (SARMs)

Da die medizinische Einnahme anaboler androgener Steroide, zum Beispiel in der Therapie von Hypogonadismus bei HIV-infizierten Männern oder bei starker Abmagerung aufgrund einer HIV-Infektion sowohl bei Frauen als auch bei Männern, unerwünschte Nebenwirkungen besitzt, wurden nicht-steroidale Alternativen zu anabolen androgenen Steroiden, die sogenannten Selektiven Androgen Rezeptor Modulatoren (SARMs), entwickelt. Dadurch soll eine höhere Lebensqualität bei diesen Patienten erreicht werden. SARMs können strukturell in vier Gruppen eingeteilt werden: Aryl-propionamid basierte, bizyklisches Hydantoin basierte, Chinolin basierte und Tetrahydrochinolin basierte SARMs (Thevis et al., 2006). Die Struktur eines Aryl-propionamid basierten SARMs, ein Analogon von Bicalutamid, wurde erstmals 1998 veröffentlicht (Dalton et al., 1998). Bald darauf wurden viele andere SARMs synthetisiert. Die Struktur zweier Aryl-propionamid basierter SARMs ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

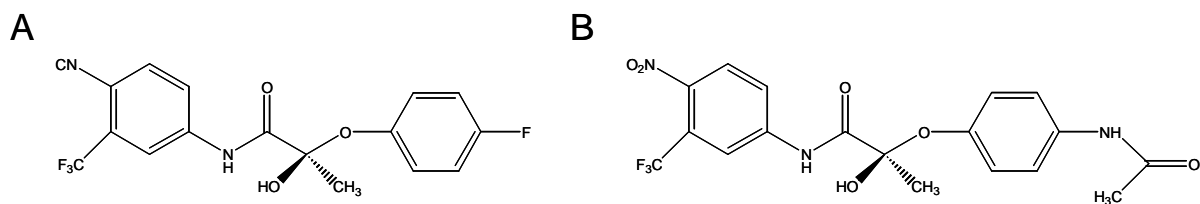


Abbildung 1.7 Struktur von SARM 4-F (A) und SARM S4 (B).

Bei SARMs handelt es sich um Moleküle die organspezifisch den Androgenrezeptor zum Beispiel in Muskel- oder Knochengewebe aktivieren, gleichzeitig aber im Vergleich zu den bisherigen anabolen Steroiden weniger Nebenwirkungen, wie Bluthochdruck, Unfruchtbarkeit, Verweiblichung von Männern, Leberschäden oder Depressionen besitzen (Thevis und Schänzer, 2010). Sie sind meist oral verfügbar und werden nicht durch die 5α -Reduktase oder die Aromatase metabolisiert (Mohler et al., 2005). Derartige Substanzen befinden sich zurzeit in fortgeschrittenen klinischen Studien. Aufgrund ihrer Eigenschaften besitzen sie ein großes Potential für Dopingzwecke missbraucht zu werden. Deshalb wurden sie 2008 zur WADA Liste verbotener Substanzen hinzugefügt (Kazlauskas, 2010). Der Nachweis von SARMs erfolgt, wie auch bei den anabolen Steroiden mittels chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden (Thevis und Schänzer, 2009).

1.7 Doping

1.7.1 Geschichte des Dopings

Die Geschichte des Dopings geht sehr weit zurück. In der Literatur ist beschrieben, dass schon während der Olympischen Spiele der Antike halluzinogene Pilze zur Leistungssteigerung eingenommen wurden (Müller, 2010). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts begannen zahlreiche Sportler während Wettkämpfen leistungssteigernde Mittel, wie Alkohol, Kokain, Koffein oder Strychnin zu verwenden (Duggan, 2004). Ab 1967 wurde vom Internationalen Olympischen Komitee Doping durch die erstmalige Auflistung verbotener Substanzen untersagt und seit den Olympischen Sommerspielen 1968 in Mexiko City wurden routinemäßig Dopingkontrollen durchgeführt (Begley und Clifton, 2000). Im Jahre 1999 wurde die Welt Antidoping Agentur WADA gegründet, die am 1.1.2004 den international gültigen Welt Anti Doping Code herausgegeben hat und sich seitdem für den internationalen Anti-Doping Kampf zuständig zeigt. Die WADA gibt die jeweils gültige Liste der verbotenen Wirkstoffe und Methoden, sowie die Dopingstatistik heraus. Die Statistik von 2009 zeigt zum Beispiel, dass in 2 % der getesteten Proben verbotene Substanzen entdeckt werden konnten. In 65 % dieser positiven Befunde wurden anabole Substanzen nachgewiesen. Schon um 1960 gelangte die Klasse der anabolen androgenen Steroide auf den ersten Platz in der Statistik von Dopingfällen (Müller, 2010).

Bis in die 70er Jahre war der sensitive und sichere Nachweis von Dopingsubstanzen sehr schwer. Erste Fortschritte wurden 1972 durch die Anwendung von Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie erzielt. Durch die weitere technische Entwicklung von neuen Analytikmethoden folgte schnell der Einsatz der Massenspektrometrie (MS) und die Kombination dieser mit der Gaschromatographie (GC) (Müller, 2010). Seit den 90er Jahren wurde die GC-MS Methode durch die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS), die Tandemmassenspektrometrie (MS/MS), die Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS) und die Kombination aus MS und Flüssigkeitschromatographie (LC-MS) anstelle von GC erweitert (Müller, 2010).

1.7.2 Anabole androgene Substanzen im Doping

Anabole Substanzen wurden 2009 in 65 % aller von der WADA positiv getesteten Proben nachgewiesen (WADA, 2009). Sie führen seit Jahren mit 59 % aller positiv getesteten Proben im Jahr 2008, mit 48 % im Jahr 2007 und mit 45 % im Jahr 2006 die Dopingliste an. Der zunehmende Anteil der detektierten anabolen Steroide könnte auf eine zunehmende Anzahl von Dopingfällen mit diesen Substanzen oder aber auf einen besseren Nachweis dieser Substanzen hinweisen. Die am häufigsten konsumierten anabolen Steroide sind Testosteron und vom Testosteron abgeleitete synthetische Steroidhormone, wie Stanozolol, Metandienon oder Methyltestosteron (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Häufigkeiten von detektierten Einzelsubstanzen in der Gruppe der anabolen Stoffe (WADA, 2009)

Anabole Substanz	Häufigkeiten der Einzelsubstanzen in der Gruppe der detektierten anabolen Stoffe
Testosteron	70.3 %
Stanozolol	6.3 %
Nandrolon	4.7 %
Metandienon	3.3 %
Metenolon	1.3 %
Boldenon	1.3 %
Mesterolon	0.8 %
Drostanolon	0.7 %
Methyltestosteron	0.5 %
Dehydrochlormethyltestosteron	0.4 %
Oxandrolon	0.3 %

Die zur Leistungssteigerung verwendeten Steroidhormone besitzen meist androgene und anabole Wirkung. Die anabole Wirkung wird über eine gesteigerte Proteinsynthese vermittelt, was zum Muskelaufbau bei gleichzeitiger Verringerung des Fettanteils am Gesamtkörpergewicht führt. Außerdem wird angenommen, dass anabole Steroide die Regenerationsfähigkeit des Konsumenten erhöhen. Die androgene Wirkung dieser Substanzen ist meist ein unerwünschter Nebeneffekt und beeinflusst die inneren und äußeren Geschlechtsorgane (Feiden und Blasius, 2008).

1.7.3 Nebenwirkungen anaboler androgener Steroide

Durch die Verwendung von anabolen androgenen Steroiden können vielfältige Nebenwirkungen auftreten, die vielfach in der Struktur des verabreichten Steroids begründet sind. Schon kleine Modifikationen in der Struktur können verschiedenartige Wirkungen auf den Organismus hervorrufen. So ist zum Beispiel eine 5α -Dihydrogenierung oft mit verstärkten androgenen Effekten assoziiert. Östrogene Nebenwirkungen beruhen auf der Anfälligkeit der Steroidstruktur für eine A-Ring Aromatisierung. Eine starke Lebertoxizität wird durch eine 17α -Alkylierung und die damit verbundene Inhibierung der metabolischen Inaktivierung von Steroiden durch Oxidation der 17β -Hydroxygruppe hervorgerufen. Dies ist zum Beispiel bei Methyltestosteron, Metandienon oder Stanozolol der Fall (Büttner und Thieme, 2010).

Nebenwirkungen können reversibel oder irreversibel Organe oder Organsysteme betreffen. Durch die Einnahme von anabolen androgenen Steroiden ist vor allem das endokrine System mit folgenden Mechanismen stark betroffen. Die exogene Zufuhr von anabolen Substanzen reduziert die Gonadotropin Sekretion (FSH, LH) durch negative Rückkopplungsmechanismen der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse in Frauen und Männern. Dadurch kommt es zu einer verminderten Synthese und Ausschüttung körpereigener Steroidhormone. Die exogen zugeführten anabolen androgenen Steroide können dieses Defizit bei Männern jedoch nicht kompensieren, da sie die Blut-Hoden-Schranke nicht passieren können. Deswegen kann es zum Beispiel zu Unfruchtbarkeit, Hodenatrophie und verminderter Spermatogenese kommen. Nebenwirkungen bei Frauen lassen sich auf die maskulinisierende Wirkung von anabolen androgenen Steroiden zurückführen. Nach Langzeitanwendung können Störungen des Menstruationszyklus, Virilisierung, Klitorisvergrößerung und sekundäre Amenorrhoe (Ausbleiben der Regelblutung für mehr als 3 Monate) auftreten. Auch ein veränderter Glucosemetabolismus kann die Folge des Missbrauchs anaboler androgener Substanzen bei Frauen als auch bei Männern sein (Büttner und Thieme, 2010). Durch die Beeinflussung des kardiovaskulären Systems kann es zu Bluthochdruck, Thrombose und sogar zum plötzlichen Herztod kommen. In der Leber und Niere sind Gallen- bzw. Nierensteine Folgen der Anwendung anaboler androgener Steroide. Da Androgene hauptsächlich in der Leber metabolisiert werden, können vor allem durch die sehr lebertoxischen 17α -alkylierten Substanzen starke Leberschäden, wie *Peliosis hepatis*, auftreten. Veränderungen im Verhalten äußern sich zum Beispiel durch Aggressivität und Depressionen. Weitere Nebenwirkungen anaboler androgener Steroide sind außerdem Akne, Durchfall, Knochenschmerzen und ein vorzeitiges Schließen der Epiphysenfuge bei Jugendlichen (Büttner und Thieme, 2010).

1.7.4 Zusammenhang von Struktur und Stabilität anaboler androgener Steroide

Ausgehend vom Testosteron oder von DHT wurden viele Derivate mit bestimmten Eigenschaften, wie einer verlängerten Wirksamkeit durch größere Stabilität, synthetisiert. Um die Aktivität synthetischer anaboler Steroide, vor allem nach oraler Einnahme, zu verlängern, wird die 17 β -Hydroxygruppe durch Alkylierung in Position 17 α gegen Oxidation in der Leber geschützt. Eine Methylierung an Position 17 steigert die orale Verfügbarkeit der Steroide, erhöht aber ihre Lebertoxizität stark (Westaby et al., 1977). Typische Modifikationen um die Aromatisierung und/oder die Sättigung des A-Ringes zu verhindern sind (Büttner und Thieme, 2010):

- Alkylierung in Position 1 oder 2 (z. B. Mesterolone, Metenolon)
- A-Ring Kondensation (z. B. bei Stanozolol zu einer Pyrazolstruktur)
- Chlorierung an Position 4 (z. B. 4-Chlorodehydro-methyltestosteron, Clostebol)
- Einführung eines Sauerstoffatoms an Position 2 (z. B. Oxandrolon)
- Einführung einer Doppelbindung an Position 1-2 (z. B. Boldenon, Metandienon)
- Reduktion der 4-5 Doppelbindung (z. B. Mesterolone, Metenolon)
- Entfernen der C19-Methylgruppe (z. B. Nandrolon)

Die wichtigsten chemischen Veränderungen an den Positionen 1, 2, 4, 17 und 19 durch Methylierung, Chlorierung, Dehydrogenierung oder dem Entfernen einer Methylgruppe sind ausgehend vom Testosteron in Abbildung 1.8 dargestellt.

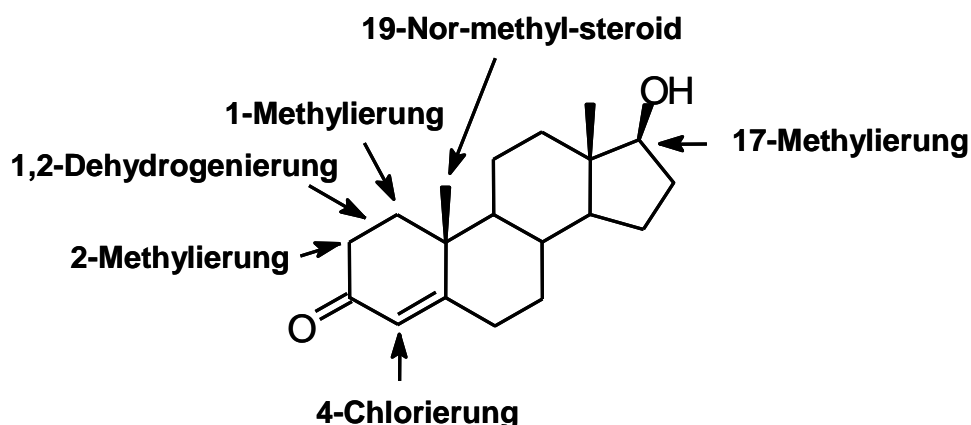


Abbildung 1.8 Testosteron Steroidgerüst und seine häufigsten chemischen Modifikationen zur Herstellung synthetischer Steroidhormone (Abb. verändert nach Wilhelm Schänzer, Institut für Biochemie, Zentrum für Präventive Dopingforschung, Deutsche Sporthochschule Köln)

1.7.5 Anabole androgene Steroide im Urin

Im Urin treten Androgene meist mit Glucuronsäure (resultierend in Glucuroniden) oder 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulphat (resultierend in Sulphaten) konjugiert auf (Kicman, 2010). Testosteron-Glucuronid ist, wenn der Urin bei unter -20°C gelagert wird, für mindestens ein Jahr im Urin stabil (Venturelli et al., 1995). Testosteron- und Epitestosteron-Konjugate sind in sterilem Urin bei einer Lagerung bei 4°C oder -20°C für Monate stabil (Jimenez et al., 2006). Nicht-sterile Bedingungen führen zu schnellem Bakterienwachstum und zur Umwandlung der Steroide im Urin, was hauptsächlich durch Hydrolyse der Steroidkonjugate und durch oxidoreduktive Reaktionen hervorgerufen wird (Ayotte, 2010).

1.7.6 Einige wichtige dopingrelevante synthetische anabole androgene Steroide

Exemplarisch werden einige oft für Doping missbrauchte Substanzen vorgestellt. Keine dieser Substanzen ist in Deutschland als humanes Medikament im Handel (Portal für Arzneimittelinformationen des Bundes und der Länder). Die hier vorgestellten Substanzen wurden zur Charakterisierung der Hefeassays verwendet.

1.7.6.1 Boldenon

Boldenon (17 β -Hydroxy-androsta-1,4-dien-3-on) ist ein 1,2-dehydro-Derivat von Testosteron (Abbildung 1.9), wurde 1956 erstmals synthetisiert und wird seit 2005 auf der Liste verbotener Substanzen der WADA geführt (Buiarelli et al., 2005). Es wird vor allem im Bodybuilding und in der Rinderzucht zur Erhöhung der Muskelmasse missbraucht (Gryglik et al., 2010).

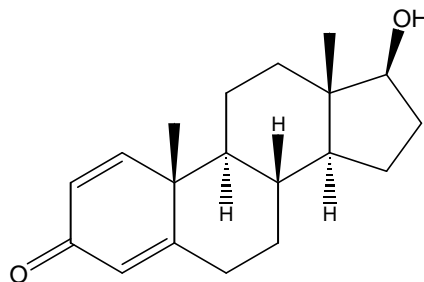


Abbildung 1.9 Struktur von Boldenon

1.7.6.2 Mesterolone

Mesterolone (17 β -Hydroxy-1 α -methyl-5 α -androstan-3-on) ist ein 1-Methylderivat von DHT (Abbildung 1.10). Es wurde erstmals 1965 synthetisiert und zur Behandlung von Hypogonadismus und Infertilität eingesetzt (Ho et al., 2007). Mesterolone wurde in mehreren klinischen Studien getestet. Dabei wurde eine ähnliche Androgenität wie für 17 α -Methyltestosteron festgestellt. Die fehlende Alkylierung an Position 17 macht Mesterolone jedoch weniger lebertoxisch (Luisi und Fassorra, 1972).

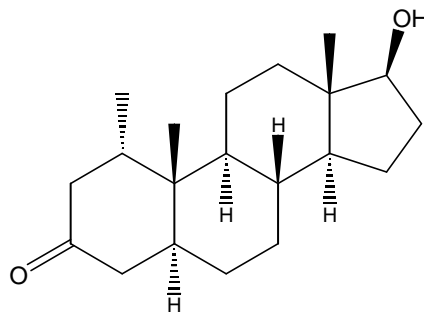


Abbildung 1.10 Struktur von Mesterolone

1.7.6.3 Metandienon

Metandienon (17 β -Hydroxy-17 α -methylandrosta-1,4-dien-3-on) wurde erstmals 1955 aus 17 α -Methyltestosteron (einem der ersten synthetischen Testosteronanaloga) durch Einfügen einer Doppelbindung an Position C1-C2 synthetisiert (Abbildung 1.11). Dadurch besitzt das Derivat eine längere Halbwertszeit im Blutplasma und eine bessere orale Bioverfügbarkeit durch langsamere Metabolisierung. Durch die 17 α -Methylierung ist die Substanz oral verfügbar aber auch stark lebertoxisch (Kazlauskas, 2010).

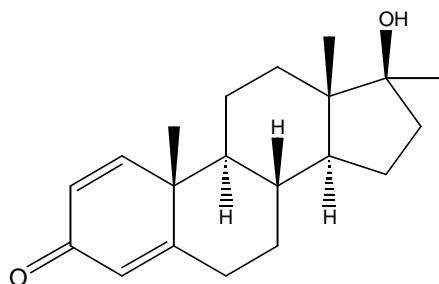


Abbildung 1.11 Struktur von Metandienon

1.7.6.4 Metenolon

Metenolon ((5 α , 17 β)-17-Hydroxy-1-mthylandro-1-en-3-on) wurde 1960 von der Schering AG entwickelt und als Primobolan auf den Markt gebracht. Im Vergleich zu Testosteron besitzt Metenolon eine Methylgruppe in Position 1, sowie eine Doppelbindung zwischen Position C1 und C2 (Abbildung 1.12). Metenolon wird in der Medizin, als auch im Doping oral als Metenolonacetat bzw. intramuskulär als Metenolonenanthat appliziert und besitzt nur eine schwach androgene, aber stark anabole Wirkung (Schänzer, 2010).

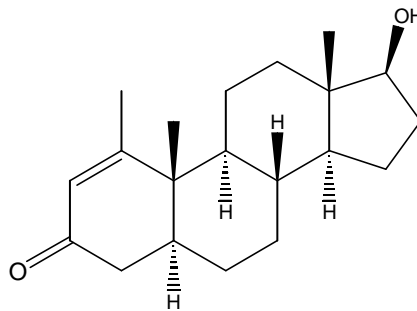


Abbildung 1.12 Struktur von Metenolon

1.7.6.5 Methyltestosteron

Methyltestosteron (17 β -Hydroxy-17 α -methylandro-4-en-3-on) wurde synthetisiert um die Wirkung von Testosteron nach oraler Einnahme zu verlängern. Oral eingenommenes Testosteron wird in der Leber stark abgebaut. Die 17 α -Methylierung macht Methyltestosteron (Abbildung 1.13) widerstandsfähiger gegenüber diesem Abbau. Methyltestosteron wurde 1939 durch Foss in die klinische Medizin eingeführt (Foss und Simpson, 1959) und bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt (Segaloff et al., 1953).

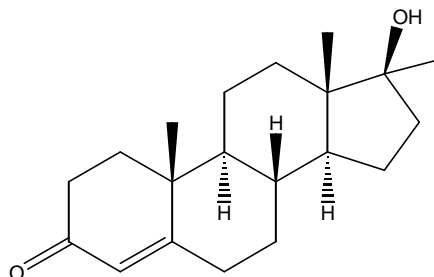


Abbildung 1.13 Struktur von Methyltestosteron

1.7.6.6 Nandrolon

Nandrolon (17 β -Hydroxy-estr-4-en-3-on) entsteht durch das Entfernen der 19-Methylgruppe von Testosteron und wird deshalb auch als 19-Nortestosteron bezeichnet (Abbildung 1.14).

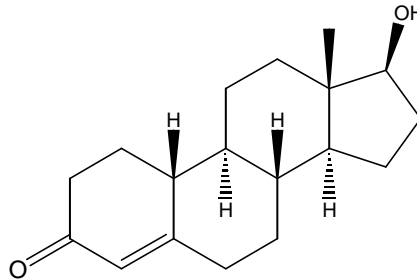


Abbildung 1.14 Struktur von Nandrolon

Als Medikament wird Nandrolon unter anderem bei schweren Verbrennungen, Krebs, AIDS und Osteoporose verwendet (Büttner und Thieme, 2010). Es wurde in den frühen 50igern erstmals synthetisiert und besitzt geringere androgene Effekte als Testosteron bei ähnlicher anaboler Wirkung (Büttner und Thieme, 2010). Außerdem wird Nandrolon nur in geringem Maße zu Östrogenen umgewandelt wodurch es als Dopingsubstanz attraktiv ist und oft missbraucht wird. In den Muskel injizierbare Depotpräparate, wie Fettsäureester von Nandrolon, die in der Medizin eingesetzt werden, finden vor allem im nicht dopingkontrollierten Fitnessbereich Anwendung. Im dopingüberwachten Leistungssport werden sie aufgrund der guten Nachweisbarkeit kaum eingesetzt. Hier kommen vor allem oral anwendbare Prohormone von Nandrolon wie 4-Norandrostendion, 4-Norandrostendiol und 5-Norandrostendiol zum Einsatz (Schänzer, 2010).

Die zwei Hauptmetabolite von Nandrolon sind Norandrosteron und Noretiocholanolon.

Obwohl Nandrolon ein synthetisches Steroid ist, konnte gezeigt werden, dass sowohl Männer als auch Frauen natürlicherweise und in sehr geringen Mengen Nandrolon als ein Nebenprodukt der Östrogenbiosynthese mit dem Urin ausscheiden. Außerdem wird Nandrolon spontan im Urin aus dem Hauptmetaboliten des Testosterons, dem Androsteron, gebildet. Diese Umwandlung findet jedoch nur selten in Urinproben statt. Allerdings können auch Spiegel spontan gebildeten Nandrolons oberhalb des WADA-Grenzwertes von 2 ng/ml Urin liegen. Im September 2004 konnte das Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln in einer Wettkampfkontrollprobe eine Konzentration von 5,2 ng Nandrolon pro ml Urin auf eine spontane Bildung von Nandrolon im Urin zurückführen (Schänzer, 2010). Die Ursache für diese spontane Bildung ist noch nicht bekannt. Es wird

eine 19-Demethylierung durch bisher unbekannte Mikroorganismen angenommen (Hebestreit et al., 2006).

1.7.6.7 Oxandrolon

Oxandrolon (17 β -Hydroxy-17 α -methyl-2-oxa-5 α -androstan-3-on) wurde erstmals 1962 synthetisiert und ist ein oral verfügbares 17-Methylsteroid mit einem zusätzlichen Sauerstoffatom an Position zwei (Abbildung 1.15).

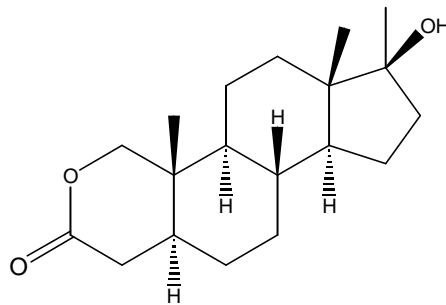


Abbildung 1.15 Struktur von Oxandrolon

Es ist vergleichsweise wenig androgen. Oxandrolon ist in den USA, aber nicht in Deutschland, für die Behandlung von alkoholischer Hepatitis, dem Turner Syndrom und dem Gewichtsverlust durch HIV zugelassen. Im Gegensatz zu vielen anderen 17-Methylsteroiden wird Oxandrolon zum großen Teil unverändert und nicht konjugiert mit dem Urin ausgeschieden (Schänzer, 2010).

1.7.6.8 Stanozolol

Stanozolol (17 β -Hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstan[3,2-c]pyrazol) wurde erstmals 1959 synthetisiert. Es ist ein oral verfügbares 17-Methylsteroid und besitzt einen an C2 und C3 kondensierten Pyrazolring (Abbildung 1.16).

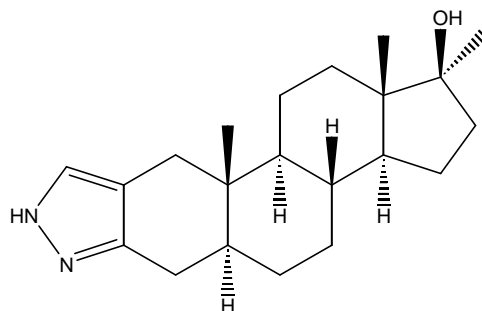


Abbildung 1.16 Struktur von Stanozolol

Seine Wirkung ist sehr stark anabol, aber wenig androgen. Deshalb wird es auch heute noch oft zum Doping missbraucht. Die oral verfügbare Form von Stanozolol wird hauptsächlich für den humanen Gebrauch vermarktet, wogegen eine wässrige Lösung zur Injektion in der Tiermedizin angewandt wird. Viele der tiermedizinischen Präparate werden allerdings auch von Athleten zum Muskelaufbau verwendet (Kazlauskas, 2010). Stanozolol wurde 1988 während der Olympischen Spiele in Seoul durch den spektakulären Dopingfall von Ben Johnson bekannt (Boudreau und Konzak, 1991).

1.7.7 Designer-Steroide

Einige Sportler sind dazu übergegangen, so genannte Designer Steroide einzunehmen. Diese Stoffe besitzen eine ähnliche Struktur wie bekannte Substanzen, sind aber chemisch so verändert, dass deren Nachweis erschwert ist (Kazlauskas, 2010). Hinsichtlich ihrer Wirkung und Sicherheit im Menschen liegen meist keine Studien vor, was die Einnahme dieser Substanzen aufgrund fehlender Kenntnisse über mögliche Nebenwirkungen sehr gefährlich macht (Kazlauskas, 2010). Diese Stoffe werden außerdem oft ohne genaue Kennzeichnung Nahrungsergänzungsmitteln zugesetzt. Dabei werden sogar komplexe Steroidgemische aus unreinen Rohmaterialien verwendet. Mögliche Nebenwirkungen wurden dabei jedoch unzureichend untersucht (Kazlauskas, 2010). Der Nachweis von Designer Steroiden erfolgt wie bei anderen Steroiden mittels GC-MS, GC-MS/MS und LC-MS/MS. Der Nachweis unbekannter Substanzen ist dabei allerdings erschwert.

Ein Beispiel eines Designer Steroids ist Estra-4,9-dien-3,17-dion (Präparatname: Trenbolox). Diese Substanz ist ein Strukturanalogue zu 17β -Hydroxy-estra-4,9,11-trien-3-on (Präparatname: Trenbolon). Im Unterschied zu 17β -Hydroxy-estra-4,9,11-trien-3-on wurde bei Estra-4,9-dien-3,17-dion die C11-C12 Doppelbindung zur Einfachbindung umgewandelt und an C17 die Hydroxygruppe durch eine Carbonylgruppe ersetzt (Abbildung 1.17).

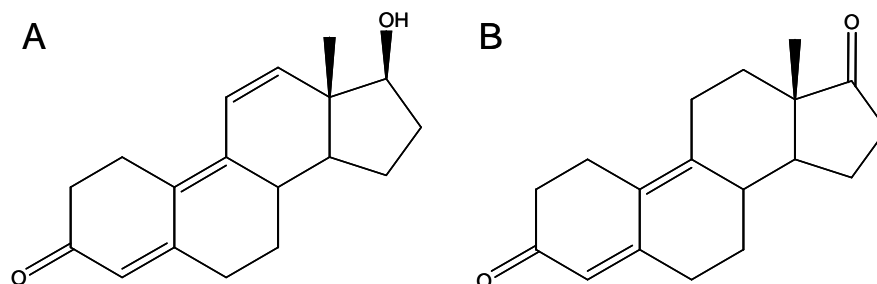


Abbildung 1.17 Struktur von 17β -hydroxy-estra-4,9,11-trien-3-on (A) und Estra-4,9-diene-3,17-dion (B).

Estra-4,9-dien-3,17-dion wird zurzeit in einigen Nahrungsergänzungsmitteln vermarktet und in Internetforen diskutiert (Parr et al., 2008; Scarth et al., 2010).

Ein weiteres Designer Steroid ist 1-Androsteron (3β -Hydroxy-5 α -androst-1-en-17-on). Beispielsweise gelang es dem Landeskriminalamt Schleswig-Holstein ein Präparat mit der Markenbezeichnung „*Advanced Muscle Science*“ zu beschlagnahmen, in welchem durch Parr et al. (2010) das Steroid 1-Androsteron nachgewiesen werden konnte (Parr et al., 2011). Die Struktur von 1-Androsteron ist in Abbildung 1.18 dargestellt.

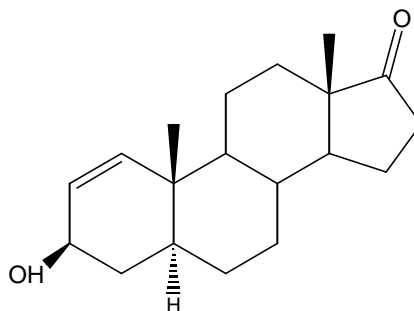


Abbildung 1.18 Struktur von 1-Androsteron

1.7.8 Einnahme anaboler Substanzen im Freizeitsport

Neben der starken Präsenz von Doping im Leistungssport, stellt auch zunehmend im Freizeitsport die Einnahme anaboler Substanzen ein Problem dar. Dort konzentriert sich der Missbrauch vor allem in der Bodybuildingszene. Bei einer Studie in 113 deutschen Sportstudios gaben 13,5 % aller befragten Personen an, anabol wirkende Substanzen genommen zu haben (Striegel et al., 2006). Die Einnahme oder Injektion von anabolen androgenen Steroiden zur Leistungssteigerung verursacht jedoch wie bereits erwähnt, eine Reihe von Nebenwirkungen, wodurch es zu irreversiblen Schädigungen kommen kann.

1.7.9 Doping im Tiersport

Doping spielt auch im Tiersport, vor allem bei Pferde- und Windhundrennen, eine Rolle (Houghton und Maynard, 2010). Bei in Deutschland durch das Dopinglabor der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführten Pferdesportkontrollen waren 2009 0.35 % der Trainingskontrollen und 2.40 % der Wettkampfkontrollen positiv (Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln, 2009). In Deutschland ist Doping an Tieren durch das Tierschutzgesetz Paragraph 3 verboten (Houghton und Maynard, 2010).

1.8 Hormonpräparate zur Wachstumsförderung in der Nahrungsmittelproduktion

Anabole Substanzen können auch das Muskelwachstum in Nutztieren, vor allem in Rindern und Schweinen, fördern. Um die Konsumenten zu schützen wurden deshalb 1988 in der gesamten Europäischen Union anabole Substanzen in der Mast verboten. Substanzen wie Testosteron, Progesteron und Trenbolon wurden aber weiterhin illegal zur Tiermast verwendet. Deshalb werden seit 1986 Kontrollen bei Nutztieren, mittels des Nachweises von verbotenen Substanzen in Urin, Kot oder Haaren durchgeführt. Auch die Galle, das Blut, die Augen, die Leber oder die Nieren von Schlachttieren werden mit in der EU einheitlichen Methoden auf unerwünschte Substanzen untersucht (Stephany, 2010).

1.9 Nachweisverfahren von endokrin wirksamen Steroiden

Es gibt viele verschiedene Methoden um endokrine Eigenschaften von Umweltschadstoffen, neue Substanzen für therapeutische Zwecke oder den Missbrauch endokriner Substanzen zum Beispiel im Doping oder in der Tiermast zu detektieren. Dabei können die Substanzen spezifisch detektiert und quantifiziert werden oder anhand ihrer biologischen Aktivität nachgewiesen werden. Zu den spezifischen Nachweismethoden gehören klassische Methoden wie Flüssigkeitschromatographie (LC) oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GC-MS), Gaschromatographie – Tandemmassenspektrometrie (GC-MS/MS) oder Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS). Die routinemäßig in der Dopinganalytik genutzten Nachweismethoden für anabole androgene Steroide sind GC-MS, GC-MS/MS und LC-MS/MS.

Zu den Nachweismethoden mittels der biologischen Aktivität von Substanzen zählen unter anderem Assays mit humanen Zelllinien, enzymgekoppelte Rezeptorassays und Hefeassays (Maser und Xiong, 2010). Zu den Assays mit humanen Zelllinien gehört zum Beispiel der Proliferationsassay mit MCF-7 Zellen, einer humanen Brustkrebszelllinie, für den Nachweis östrogenen Wirkungen von Substanzen. Bei enzymgekoppelten Rezeptorassays wird zum Beispiel 17 β -Östradiol auf einer Oberfläche immobilisiert. Die zu messenden Proben werden in diesem Fall mit einer definierten Menge Östrogenrezeptor inkubiert und auf die Oberfläche gegeben. Noch frei in der Lösung vorliegende Rezeptoren binden an das Östradiol auf der Oberfläche und werden mittels Antikörpern detektiert. Dadurch kann die Östrogenität einer Substanz oder eines Stoffgemisches bestimmt werden.

1.10 Hefeassays zum Nachweis endokriner wirksamer Substanzen

Es existieren zahlreiche Hefeassays um die Aktivität endokriner Substanzen nachzuweisen. Dabei gibt es Steroidhormonrezeptor-Reporter-gen-Hefeassays, welche die humanen Östrogenrezeptoren α oder β , den humanen Androgenrezeptor oder den humanen Progesteronrezeptor exprimieren (Gaido et al., 1997). Außerdem werden verschiedene Reporter, wie β -Galactosidase (Gaido et al., 1997; Routledge und Sumpter, 1995; Sohoni und Sumpter, 1998), das grün fluoreszierende Protein GFP (Beck et al., 2008), eine Phytase (Hahn et al., 2006) oder Biolumineszenz (Eldridge et al., 2007; Michelini et al., 2005; Sanseverino et al., 2005) verwendet. Hefeassays brauchen im Allgemeinen keine spezielle Laborausrüstung und keine komplexe Vorbehandlung der Proben. Außerdem zeichnen sich Hefeassays durch Robustheit gegenüber toxischer Eigenschaften von Testsubstanzen (Beck et al., 2008), geringe Kosten und einfache Handhabung aus. Auch sind im Hefemedium im Gegensatz zu den meisten Medien für humane Zellkulturen natürlicher Weise keine störenden Steroide enthalten. Dies stellt im Vergleich zu Assays mit Säugetierzelllinien einen weiteren Vorteil dar. Da die biologische Aktivität von Substanzen nachgewiesen wird, ist die Kenntnis über deren chemische Struktur nicht notwendig.

Ein Nachteil von aktivitätsbasierten Nachweismethoden, wie den Hefeassays ist, dass Substanzen nicht direkt nachgewiesen werden können. Es muss stets eine Analyse mittels der klassischen Methoden folgen um eine Substanz bzw. das Substanzgemisch in einer Probe zu identifizieren und zu quantifizieren. Außerdem können manche Substanzen, die leicht in Säugetierzellen diffundieren, die Hefezellwand nicht durchdringen (Parenteau et al., 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass es in Hefen, wie in Säugerzellen, so genannte ABC-Proteine gibt, die als Pumpen fungieren und Substanzen, die die Zelle schädigen oder die von der Zelle nicht gebraucht werden, wieder ausschleusen. Dies sind je nach Spezies unterschiedliche Substanzklassen. Für Hefen konnte gezeigt werden, dass auch Steroide aktiv aus der Zelle geschleust werden (Ernst et al., 2005). Auch der unterschiedliche Metabolismus von Hefen im Vergleich zu humanen Zellen kann ein Problem darstellen, wenn Testsubstanzen in der Hefe zu unwirksamen Metaboliten umgewandelt werden oder eine im Menschen stattfindende Metabolisierung von unwirksamen Substanzen in wirksame in der Hefe nicht erfolgt. All dies kann zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die für Hefeassays bisher verwendeten Hefen sind *Saccharomyces (S.) cerevisiae* (Sohoni und Sumpter, 1998), *Schizosaccharomyces (S.) pombe* (Jiao et al., 2008) und *Arxula adenivorans* (Hahn et al., 2006), eine dimorphe Hefe aus der Familie der *Saccharomycetaceae*. Die am häufigsten verwendete Hefe ist *S. cerevisiae*. Bei dieser Hefe

existieren Reporterassays mit den humanen Östrogenrezeptoren α oder β , dem humanen Androgenrezeptor oder dem humanen Progesteronrezeptor. In *S. pombe* existieren Reporterassays mit dem Östrogenrezeptor α (Jiao et al., 2008; Yoo et al., 2002) aber bisher nicht mit dem Androgenrezeptor. Der rekombinante *Arxula adenivorans* Hefestamm von Hahn et al. (2006) exprimiert den humanen Östrogenrezeptor α und ein Reporter, welches eine Phytase kodiert, die in das Medium sekretiert wird.

Ein sehr gut etablierter und häufig verwendeter Hefeassay in *S. cerevisiae* um endokrine Eigenschaften von Substanzen zu analysieren ist der *yeast estrogen screen* (YES) und der *yeast androgen screen* (YAS) von Routledge und Sumpter (Routledge und Sumpter, 1995) bzw. Sohoni und Sumpter (Sohoni und Sumpter, 1998). Die entsprechenden Hefestämme besitzen eine chromosomal integrierte und konstitutiv exprimierte Kopie des humanen Gens für den Östrogenrezeptor α (*ESR1*) bzw. den Androgenrezeptor (*hARI*). Dadurch liegt der entsprechende Rezeptor zu jeder Zeit in der Hefezelle vor. Außerdem besitzen die Zellen ein Reporterplasmid mit dem *lacZ*-Gen unter Kontrolle eines Promoters mit östrogen bzw. androgen responsiven Elementen. Die Expression des *lacZ*-Gens wird durch die Bindung eines Rezeptordimer/Liganden-Komplexes an die responsiven Elemente des Promoters induziert. Die dadurch gebildete β -Galactosidase besitzt ein Signalpeptid, das zur Sekretion des Proteins aus der Zelle führt. Die nun im Zellmedium vorliegende β -Galactosidase spaltet zum Beispiel den Farbstoff Chlorophenolrot- β -D-Galactopyranosid (CPRG) im Medium, was eine Farbänderung von gelb zu rot bewirkt (Abbildung 1.19). Die Intensität dieses Farbumschlags ist wiederum proportional der endokrinen Aktivität der Testsubstanz und kann bei 540 nm in einem Plattenreader gemessen werden. Außerdem wird als Referenz die Optische Dichte der Hefesuspension bei 690 nm (OD_{690}) gemessen und vom Wert gemessen bei 540 nm subtrahiert. Dadurch fließt ein unterschiedliches Wachstum der Hefen mit in die Auswertung ein.

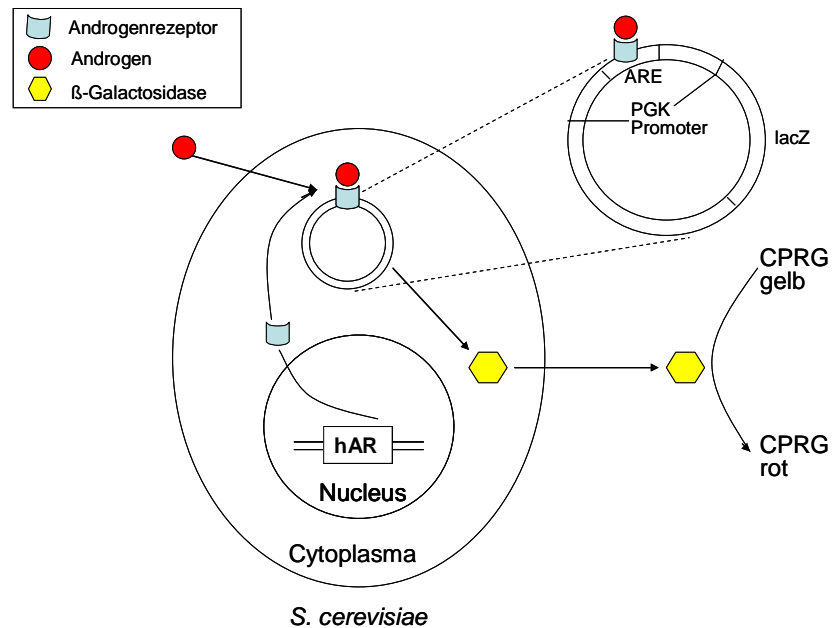


Abbildung 1.19 Schematische Darstellung des *yeast androgen screen* (YAS), verändert nach Sohoni und Sumpter, 1998. Das Gen des humanen Androgenrezeptors (hAR) ist ins Genom der Hefe integriert und wird konstitutiv exprimiert. In die Zelle wurde außerdem ein androgen-sensitives Reporterplasmid mit dem *lacZ* Gen und einem Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promoter mit 3 androgen responsiven Elementen (ARE) eingebracht. Androgene Substanzen gelangen in die Zelle, binden an den Androgenrezeptor und aktivieren dadurch das Reporterplasmid. Die β -Galactosidase wird gebildet, sekretiert und wandelt einen gelben Farbstoff (CPRG) in einen roten um.

1.11 Hefe als Modellorganismus

Als Hefen werden einzellige Pilze bezeichnet. Sie gehören zu den Eukaryoten. Die asexuelle Vermehrung erfolgt durch Knospung, wie bei *S. cerevisiae* oder durch Teilung, wie bei *S. pombe*. Einige Hefen sind außerdem in der Lage sich sexuell zu vermehren. Dabei bilden sie Sporen in Asci (Ascomycota) oder Basidien (Basidiomycota) (Campbell, 1998). Hefen sind genetisch vielseitig verwendbar, zum Beispiel für die Expression artfremder Gene oder als Modellorganismus zur Erforschung genetischer und biochemischer Prozesse eukaryotischer Zellen. Dabei ist von Bedeutung, dass sie als niedere Eukaryoten über gleiche Mechanismen für zelluläre Grundfunktionen verfügen, wie höhere Eukaryoten (Seyfert, 1998). Außerdem sind vor allem *S. cerevisiae* und *S. pombe* genetisch gut erforscht. Die Genomsequenz beider Hefen ist bekannt und mit den heutigen Methoden kann DNA leicht in die Zellen eingeschleust und wieder isoliert werden. Überdies sind sie leicht zu kultivieren und lassen sich in großem Maßstab züchten (Nelson und Cox, 2001).

In dieser Arbeit sollen Reporter-genassays in den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* etabliert werden. *S. cerevisiae* gehört zur Familie der Saccharomycetaceae, *S. pombe* zur Familie der

Schizosaccharomycetaceae. Beide Hefen sind phylogenetisch soweit voneinander entfernt, wie jede dieser Hefen zu den Wirbeltieren. Viele *S. pombe* Proteine sind sogar zu ihren homologen Proteinen in Säugetieren ähnlicher als zu denen in *S. cerevisiae* (Sipiczki, 2000). Dieser weite phylogenetische Abstand beider Hefen lässt unter anderem auch auf einen unterschiedlichen Metabolismus in beiden Hefen schließen. Auch unterscheiden sich beide Hefen im Aufbau ihrer Zellwand. Die Zellwand von *S. cerevisiae* kann in eine innere und eine äußere Schicht unterteilt werden. Die innere Schicht besteht aus Glucanpolymeren und Chitin. Hauptsächlich (80 bis 90 %) ist sie aus β 1,3-Glucanketten mit einigen β 1,6-verbundenen Glucanästen aufgebaut. Weitere Bestandteile der inneren Schicht sind β 1,6-Glucanketten (8-18 %) und Chitinketten (1-2 %). Die äußere Schicht der Zellwand besteht aus stark glycosylierten Mannoproteinen, die die innere Schicht vor Zellwand abbauenden Enzymen schützen (Levin, 2005).

Die Zellwand von *S. pombe* besteht zu 48-54 % aus β 1,3-Glucanketten mit 2-4 % β 1,6-verbundenen Glucanästen, 28-32 % aus α 1,3-Glucanketten mit 7 % α 1,4-verbundenen Glucanästen und 9-14 % Glycoproteinen zum Beispiel Galactomannan. Im Gegensatz zur *S. cerevisiae* Zellwand ist in der *S. pombe* Zellwand kein Chitin enthalten. Auch wurden mittels Elektronenmikroskopie drei Zellwandschichten bei *S. pombe* identifiziert (Perez und Ribas, 2004).

1.12 Zielstellung der Arbeit

Die steigende Anzahl der Dopingfälle in den letzten Jahren, vor allem mit anabolen androgenen Steroiden, verdeutlicht die Relevanz der Dopinganalytik im Sport. Die zur Dopinganalyse verwendete klassische MS Analytik ist jedoch sehr kosten- und zeitintensiv. Ein preiswertes und schnelles *Prescreening* Verfahren könnte deshalb Zeit und Kosten sparen helfen. Ein weiteres Prinzip neben den klassischen Methoden anabole androgene Steroide nachzuweisen, führt über deren biologische Aktivität, zum Beispiel durch die Bindung an und die Aktivierung des Androgenrezeptors. Zu diesen Nachweismethoden zählen biologische Assays wie humane bzw. tierische Zelllinien, enzymgekoppelte Rezeptorassays und Hefeassays. Hefeassays haben den Vorteil, dass sie leicht anzuwenden, schnell durchzuführen und kostengünstig sind.

In dieser Arbeit sollen zwei neue Hefeassays in *S. cerevisiae* und *S. pombe* konstruiert und hinsichtlich ihrer Eignung in der Dopinganalyse getestet werden. Als erster Schritt soll dazu ein bestehender Hefeassay von Sohoni und Sumpter (1998) charakterisiert werden. Der Fokus liegt dabei auf der Fähigkeit des Assays, dopingrelevante Substanzen in Urinproben, unabhängig von endogen vorhandenen Steroiden, zu detektieren. Ein bedeutender Teil dieser Arbeit ist außerdem, diesen Hefeassay durch den Austausch des Reportergens *lacZ* zu *EGFP* schneller und wenn möglich sensitiver zu gestalten.

Aus dem unterschiedlichen Aufbau und dem unterschiedlichen Metabolismus von humanen Zellen und Hefezellen resultieren jedoch einige Einschränkungen der Hefeassays, die oben diskutiert wurden. Um diese in allen Hefeassays auftretenden Probleme zu relativieren, soll ergänzend zu einem konstruierten EGFP-Reportergenassay in *S. cerevisiae* äquivalent erstmalig ein androgensensitiver Hefeassay in *S. pombe* etabliert und validiert werden. Durch eine Kombination dieser zwei neu konstruierten Assays mit zwei phylogenetisch sehr unterschiedlichen Hefen soll das Spektrum an nachweisbaren Substanzen erweitert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 PCR-Primer

Tabelle 2.1 Name und Sequenz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Primer. Groß geschriebene Buchstaben in der Primersequenz kennzeichnen die Schnittstelle des entsprechenden Restriktionsenzym. 5'-seitig an die Schnittstelle wurden einige Basen angehängt, um die Funktion des Restriktionsenzym zu gewährleisten.

Oligonukleotid	Sequenz in 5' nach 3' Richtung
EGFPforSpeI	tatatt ACTAGT aaaa atggtgagcaagggcgag
EGFPforBamHI	tatata GGATCC catggtgagcaagggcgag
EGFPprevBamH	tatata GGATCC ttactgtacagctcgtccatgcc
yPGKforDraI_2	tatata TTAAAA caccctcactactattatcaggg
yPGKrevSpeI_2	gg ACTAGT agatctttgtatttgttgtaaaaag
LacZforSpeI_3	tatatt ACTAGT aaaaatgtctcacgcgc
LacZrevBamHI_2	tatatt GGATCC ccgggtattattatttttgacac
pIPGKAREforSphI	tatatt GCATGC gaacaaaagctggaaacacc
pIEGFP_XhoIrev	tatatt CTCGAG ggggaccttactgttacagct
pILacZ_XhoIrev	tatatt CTCGAG ccgggtattattatttttgacacc
hAR1XhoI_for	atatat CTCGAG atggaagtgcagtagggct
hAR1BamHI_rev	tatata GGATCC tcactgggtgtggaaatagatg
hAR1BcuI(SpeI)_for	tatata ACTAGT atggaagtgcagtagggct
hAR1SalI_rev	atatat GTCGAC tcactgggtgtggaaatagatg

Die PCR-Primer wurden von Biomers synthetisiert.

2.1.2 Sequenzierprimer

Tabelle 2.2 Name, Sequenz und sequenziertes Template der verwendeten Sequenzierprimer.

Oligonukleotid	Sequenz in 5' nach 3' Richtung	Template
yPGKfor	gcataaattgggtcaatgaaga	pSumpter, pSumpterEGFP
yPGKrev1	agacaggaagtcgagcgtgt	pSumpter
yPGKrev2	cacgtgctttatgagggaaca	pSumpter
LacZfor1	ctacacaaatcagcgattcca	pSumpter
yPGKfor2	tttattttggcttcaccctcat	pSumpter
LacZfor	ttccatatggggattggtg	pSumpter
yPprev2	aagcttatcgggtgatgctg	pSumpter
pRS416rev1	tgtggaattgtgagcggata	p416PGK, p426PGK
yEGFPfor1	acatggctctgctggagttc	p416PGKEGFP, p426PGKEGFP
pl416PGKEGFP1	gtatctgcgctctgctgaag	p416PGKEGFP, p426PGKEGFP
pl416PGKEGFP2	ggattttgccgatttcgg	p416PGKEGFP, p426PGKEGFP
PGKfor	ccgaatcgtgtgacaacaac	p416PGKlacZ, p426PGKlacZ
GPDpromseq	cggtaggtattgattgtaattctg	p423GPDAR1
ARrev	ggtagaagcgtcttgagcag	p423GPDAR1, pJR1-3XLAR1
ARrev2	agatcaggcaggtcttctgg	p423GPDAR1, pJR1-3XLAR1
ARrev3	ccttcttcggctgtgaagag	p423GPDAR1, pJR1-3XLAR1
ARrev4	gcagctgagtcacctcgtc	p423GPDAR1, pJR1-3XLAR1
ARrev5	ctcatccaggaccaggtagc	p423GPDAR1
ARfor	tgtgcatgaaagcactgctac	p423GPDAR1, pJR1-3XLAR1
GPDfor	ggttgaaaccagttccctga	p423GPDAR1
ARfor2	gacctaccgaggagctttcc	pJR1-3XLAR1
nmt1for2	gattgtcattcggcaatgtg	pJR1-3XLAR1
EGFPprev	aagtcgtgctgcttcatgtg	pJR1-3XUEGFP
LacZrev	ccgtaatgggataggtcacg	pJR Klon mit <i>lacZ</i> Insert
EGFPprev	aagtcgtgctgcttcatgtg	pJR1-3XUEGFP
EGFP2rev	gctgaccctgaagttcatctg	pJR1-3XUEGFP

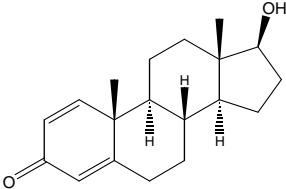
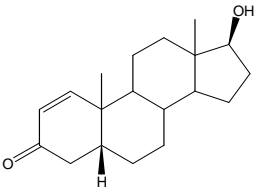
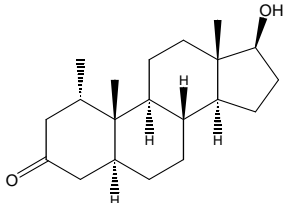
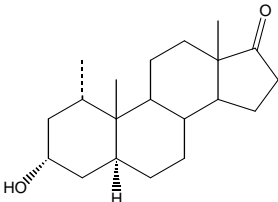
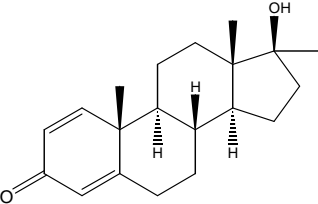
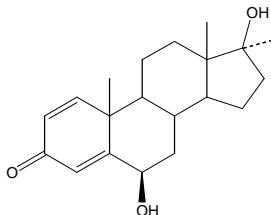
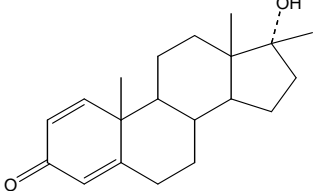
Die Sequenzierprimer wurden mit Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) erstellt und von MWG Biotech AG synthetisiert.

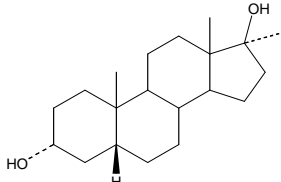
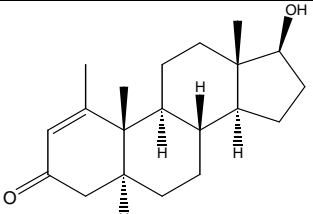
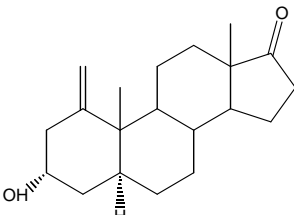
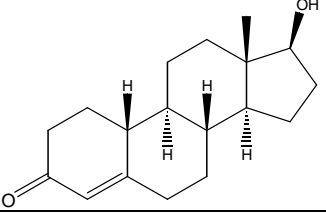
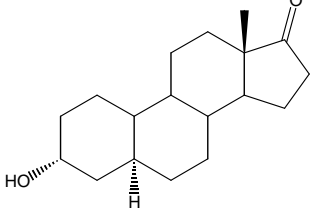
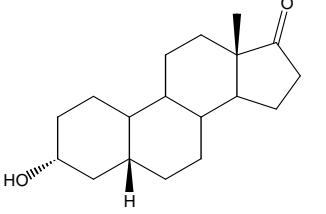
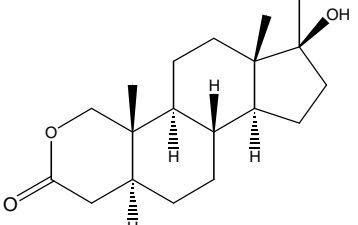
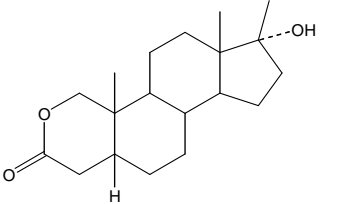
2.1.3 Getestete Substanzen

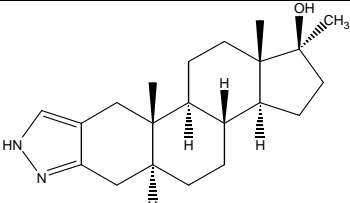
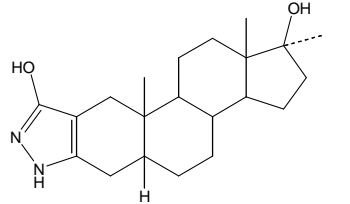
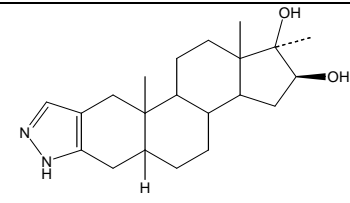
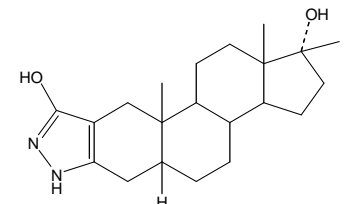
Tabelle 2.3 Herkunft getesteter Substanzen

Substanz	Firma bzw. Herstellung
Dihydrotestosteron (DHT / (5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-hydroxy-10,13-dimethyl-1,2,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydrocyclopenta[α]phenanthren-3-on)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Aldosteron (11 β ,21-Dihydroxy-3,20-dioxopregn-4-en-18-al)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dehydroepiandrosteron ((3S,8R,9S,10R,13S,14S)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16-dodecahydrocyclopenta[α]phenanthren-17-on)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dexamethason ((8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-Fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-on)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
17 β -Östradiol ((17 β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Flutamid (2-methyl-N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]-propanamid)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Nilutamid (5,5-dimethyl-3-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]imidazolidin-2,4-dion)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Bicalutamide / Casodex (N-[4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[(4-fluorophenyl)sulfonyl]-2-hydroxy-2-methylpropanamid)	Bayer Schering Pharma (Berlin, Deutschland)
6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin (6-DMAN)	Synthetisiert aus Naringenin durch Europium (III)-katalysierte Claisen-Umlagerung (Gester et al., 2001) am Institut für Organische Chemie der TU Dresden
8-Prenylnaringenin (8-PN / 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)-chroman-4-on)	Synthetisiert aus Naringenin durch Europium (III)-katalysierte Claisen-Umlagerung (Gester et al., 2001) am Institut für Organische Chemie der TU Dresden
SARM 4-F	Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
SARM S4 (S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethylpheanyl)propionamid)	Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Tabelle 2.4 Struktur und Herkunft getesteter Dopingsubstanzen und deren Metaboliten

Dopingsubstanzen und deren Metabolite	Struktur	hergestellt von:
Boldenon (17 β -Hydroxy-androsta-1,4-dien-3-on)		Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Boldenon-M1 (17 β -Hydroxy-5 β -androst-1-en-3-on)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Mesterolone (17 β -Hydroxy-1 α -methyl-5 α -androstan-3-on)		Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Mesterolone-M1 (3 α -hydroxy-1 α -methyl-5 α -androstan-17-on)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Metandienon (17 β -Hydroxy-17 α -methylandrosta-1,4-dien-3-on)		Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Metandienon-M2 (6 β ,17 β -dihydroxy-17 α -methylandrost-1,4-dien-3-on)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Metandienon-M3 (17 α -hydroxy-17 β -methylandrost-1,4-dien-3-on)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Metandienon-M4 (17 α -methyl-5 β -androst-3 α ,17 β -diol)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Metenolon ((5 α , 17 β)-17-Hydroxy-1-methyl-5 α -androst-1-en-3-on)		Bayer Schering Pharma (Berlin, Deutschland)
Metenolon-M1 (3 α -Hydroxy-1-methylen-5 α -androst-17-on)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Nandrolon (17 β -Hydroxy-estr-4-en-3-on)		Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Nandrolon-M1 (Norandrosteron / 3 α -Hydroxy-5 α -estr-17-on)		NARL (National Analytical Reference Laboratory, Australien)
Nandrolon-M2 (Noretiocholanolon / 3 α -Hydroxy-5 β -estr-17-on)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Oxandrolon (17 β -Hydroxy-17 α -methyl-2-oxa-5 α -androst-3-on)		Searl R&D (20 Jahre alter Lagerbestand des Instituts für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln)
Oxandrolon-M1 (17 β -Hydroxy-17 α -methyl-2-oxa-5 α -androst-3-on)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

Stanozolol (17 β -Hydroxy-17 α -methyl-5 α -androstano[3,2-c]pyrazol)		Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Stanozolol-M1 (3',17 β -Dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstano[3,2-c]pyrazol)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Stanozolol-M3 (16 β ,17 β -Dihydroxy-17 α -methyl-5 α -androstano[3,2-c]pyrazol)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln
Stanozolol-M4 (3',17 α -Dihydroxy-17 β -methyl-5 α -androstano[3,2-c]pyrazol)		Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln

2.1.4 Kultivierungsmedien

2.1.4.1 Kultivierung von *Escherichia (E.) coli*

Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook et al., 1998)

1 %	NaCl
1 %	Trypton/Pepton
0,5 %	Hefeextrakt

Für Platten wurde 1,5 % Agar zugegeben. Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und das Medium wurde autoklaviert. Falls nötig wurde das Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin (1000fache Stammlösung: 100 mg/ml in bidestilliertem Wasser), 15 μ g/ml Tetracyclin, 15 μ g/ml Chloramphenicol, 50 μ g/ml Kanamycin, 100 μ g/ml Spectinomycin oder 30 μ g/ml Streptomycin (Strep) ergänzt.

2.1.4.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

YPD Komplettmedium

1 %	Hefeextrakt
1 %	Trypton/Pepton
2 %	Glucose

Für Platten wurde 2,5 % Agar zugegeben. Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und das Medium wurde autoklaviert.

W₀ Minimalmedium

0,17 %	<i>Yeast nitrogen base w/o amino acids</i>
0,5 %	(NH ₄) ₂ SO ₄
2 %	Glucose

Für Platten wurde 2,5 % Agar zugegeben. Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und das Medium wurde autoklaviert. Das Medium wurde, falls nötig, mit folgenden Aminosäuren ergänzt:

Tabelle 2.5 Aminosäuren und deren Konzentrationen für das W₀ Minimalmedium

Substanz	Stammlösung 500x in bidestilliertem Wasser	Endkonzentration
L-Histidin	30 mg/ml	0,06 mg/ml
L-Leucin	40 mg/ml	0,08 mg/ml
L-Methionin	10 mg/ml	0,02 mg/ml
L-Lysin	15 mg/ml	0,03 mg/ml

Glaxo-Wachstumsmedium (Routledge und Sumpter, 1995)

5 ml	Glucoselösung
0,5 ml	Vitaminlösung
125 µl	CuSO ₄ -Lösung
1,25 ml	L-Asparaginsäurelösung
0,4 ml	L-Threoninlösung
45 ml	Glaxo Minimalmedium

Glaxo Minimalmedium (pH 7,1):

13,61 g	KH ₂ PO ₄
1,98 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
4,2 g	KOH
0,2 g	MgSO ₄ (0,235 g MgSO ₄ x H ₂ O)
1 ml	Fe ₂ (SO ₄) ₃ -Lösung (40mg/50ml H ₂ O)
50mg	L-Leucin
50 mg	L-Histidin
50 mg	Adenin
20 mg	L-Arginin-HCl
20 mg	L-Methionin
30 mg	L-Tyrosin
30 mg	L-Isoleucin
30 mg	L-Lysin-HCl
25 mg	L-Phenylalanin
100 mg	L-Glutaminsäure
150 mg	L-Valin
375 mg	L-Serin
10 ml	Penicillin (Pen)/Strep (Pen 10000 U/ml; Strep 10000 µg/ml; GIBCO)
3,3 ml	Gentamycin Sulfat (10 mg/ml; biowest)

Die Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser unter Rühren und Wärme gelöst und die Lösung wurde auf 1 Liter aufgefüllt. Das Medium wurde autoklaviert (121°C, 10 min) und bei 4°C aufbewahrt.

Vitaminlösung:

8 mg	Thiamin
40 mg	Inositol
20 ml	Biotinlösung (2 mg/100ml H ₂ O)
8 mg	Pyridoxin
8 mg	Pantothensäure

Die Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und die Lösung auf 180 ml aufgefüllt, steril mit einem 0,2 µm Filter filtriert und in einer sterilen Glasflasche bei 4°C aufbewahrt.

D-(+)-Glucoselösung:

Es wurde eine 20 %ige Lösung in bidestilliertem Wasser angesetzt, mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert (kann auch autoklaviert werden) und in Glasflaschen bei 4°C aufbewahrt.

L-Asparaginsäurelösung:

Es wurde eine Stammlösung von 4 mg/ml in bidestilliertem Wasser angesetzt mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert und in einer Glasflasche bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.

L-Threoninlösung:

Es wurde eine Lösung von 24 mg/ml in bidestilliertem Wasser hergestellt, mit einem 0,2 µl Filter steril filtriert und in einer Glasflasche bei 4°C aufbewahrt.

Kupfer(II)sulfat (CuSO₄·5H₂O; FW 249,68)-Lösung:

Es wurde eine 20mM Lösung (249,68 mg/50ml in bidestilliertem Wasser) hergestellt, steril filtriert (0,2 µl Filter) und bei 4°C RT in einer Glasflasche aufbewahrt.

Glaxo Testmedium (Routledge und Sumpter, 1995)

0,5 ml CPRG-Lösung und 52 ml frisch angesetztes Wachstumsmedium wurden gemischt und mit 0,5 ml Hefe der Testkultur mit OD1 angeimpft.

Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranosid (CPRG)- Lösung (Roche):

Es wurde eine Stammlösung von 10 mg/ml hergestellt, mit einem 0,2 μ l Filter steril filtriert und in einer sterilen Glasflasche bei 4°C aufbewahrt.

2.1.4.3 Kultivierung von *S. pombe***YEA Komplettmedium**

3 %	Glucose
0,5 %	Hefeextrakt
0,1 %	Lösung A3a
0,1 %	Lösung A3b
10 %	Uracil
5 %	L-Prolin
10 %	L-Leucin
5 %	L-Lysin

Für Platten wurde 2 % Agar zugegeben. Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und das Medium wurde autoklaviert.

MML Minimalmedium

1 %	Glucose
10 %	Lösung A2
0,1 %	Lösung A3a
0,1 %	Lösung A3b

in sterilem bidestilliertem Wasser.

Für Platten wurde 2 % Agar zugegeben und das Medium autoklaviert.

Lösung A1:

0,05 %	H ₃ BO ₃
0,004 %	CuSO ₄ x 5H ₂ O
0,011 %	KCl
0,0162 %	FeCl ₃
0,0422 %	MnSO ₄
0,0114 %	MoO ₃
0,02 %	ZnCl ₂

Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und die Lösung autoklaviert.

Lösung A2:

1 %	KH ₂ PO ₄
0,5 %	MgSO ₄
0,1 %	NaCl
0,106 %	CaCl ₂ x 7H ₂ O
5 %	(NH ₄) ₂ SO ₄
1 %	Lösung A1

Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und die Lösung autoklaviert.

Lösung A3a:

0,1 %	Calcium(D+)-panthothenat
1 %	Nicotinsäure
1 %	Meso-inositol

Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und die Lösung steril filtriert (0,2 µm Filter).

Lösung A3b:

0,001 %	Biotin in 50% Ethanol
---------	-----------------------

Die Lösung wurde steril filtriert (0,2 µm Filter).

2.1.5 Stämme

2.1.5.1 *E. coli* Stämme

DH10B (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Genotyp:

F^- *mcrA* $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *endA1* *araD139* $\Delta(ara, leu)7697$ *galU* *galK* λ^- *rpsL* *nupG*

2.1.5.2 *S. cerevisiae* Stämme

BY4741a (EUROSCARF)

Genotyp:

MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0

PGKhAR (Sohoni und Sumpter, 1998)

Genotyp:

unbekannt

2.1.5.3 *S. pombe* Stämme

HE620 (Stammsammlung des Instituts für Genetik, TU Dresden)

Genotyp:

h⁺ leu1-32 ura4-D18

KO110 (Stammsammlung des Instituts für Genetik, TU Dresden)

Genotyp:

h⁻ leu1-32 ura4-D18

2.1.6 Plasmide

2.1.6.1 p416ADH (Mumberg et al., 1995)

Das Plasmid p416ADH ist ein Hefe-Expressions-Vektor mit dem Alkoholdehydrogenase (ADH) Promoter. Der Vektor besitzt einen Cen6/ARSH4 Replikationsursprung und liegt somit in nur wenigen Kopien in der Hefezelle vor. Eine Plasmidkarte des Vektors ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

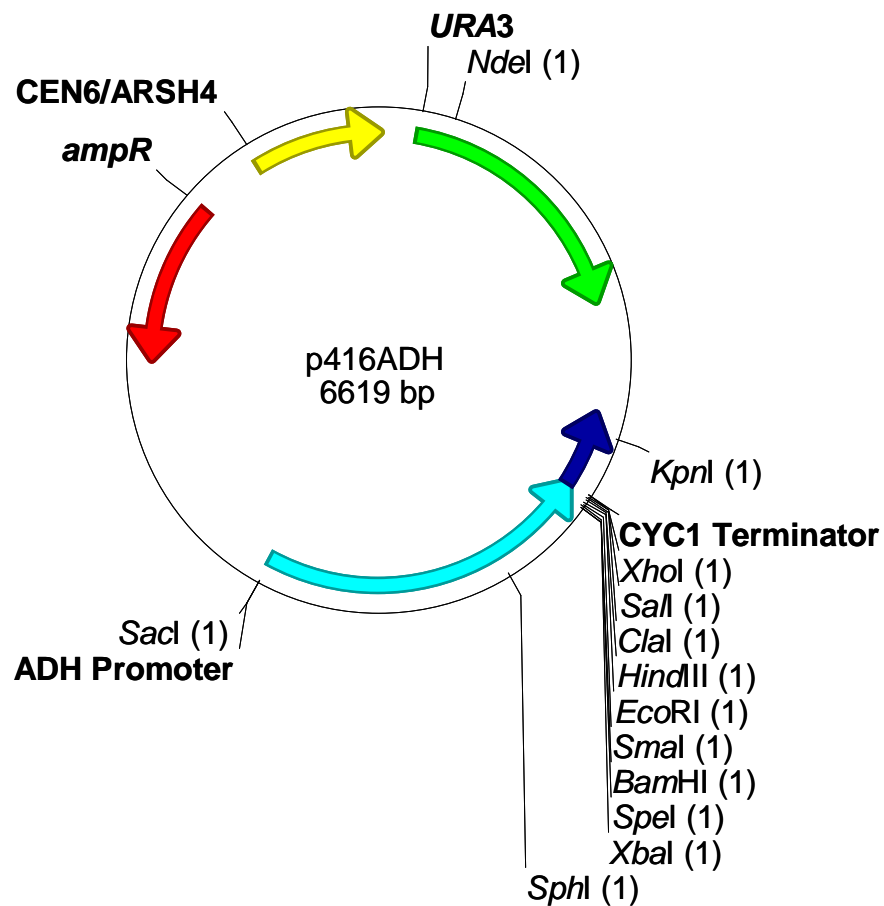


Abbildung 2.1 Plasmidkarte des Vektors p416 ADH

2.1.6.2 p426ADH (Mumberg et al., 1995)

Das Plasmid p426ADH ist ein Hefe-Expressions-Vektor mit dem ADH Promoter. Der Vektor besitzt einen 2-micron Replikationsursprung und liegt somit in hoher Kopienzahl (50-100 Kopien) in der Hefezelle vor. Eine Plasmidkarte des Vektors ist in Abbildung 2.2 gezeigt.

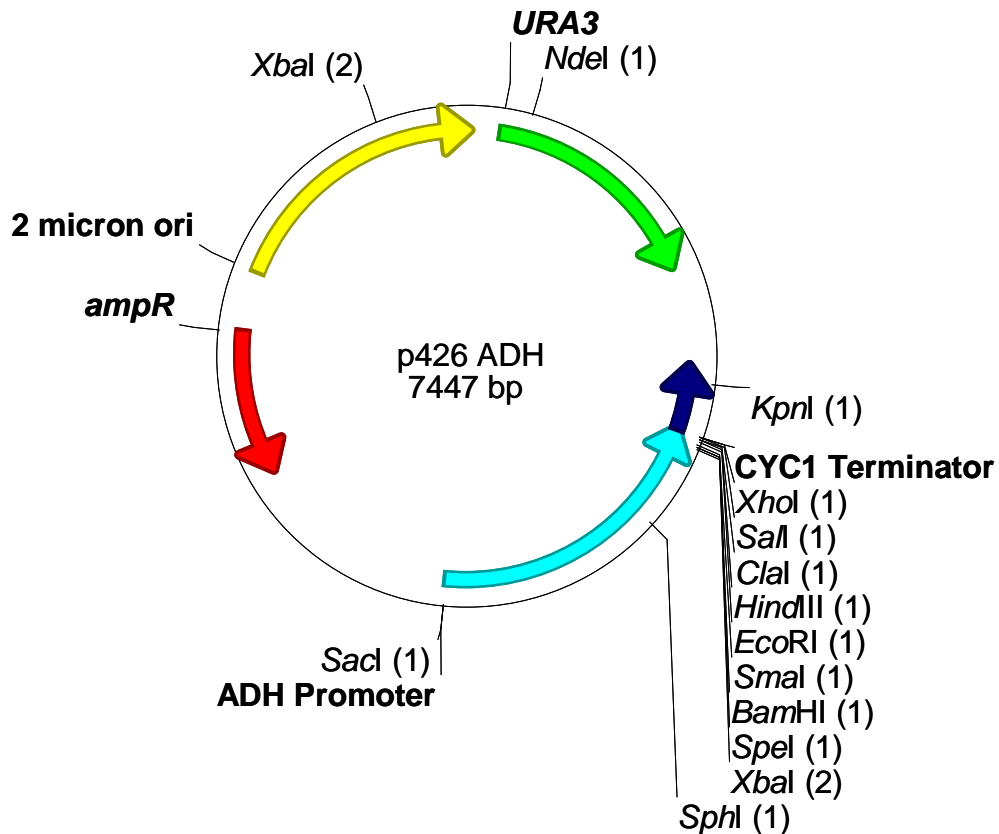


Abbildung 2.2 Plasmidkarte des Vektors p426ADH

2.1.6.3 p416ADH-EGFP

Das Gen für EGFP wurde in das Plasmid p416ADH kloniert. Das Plasmid wurde vom Institut für Genetik der TU Dresden zur Verfügung gestellt.

2.1.6.4 p423GPD (Mumberg et al., 1995)

Das Plasmid p423GPD ist ein Hefe-Expressions-Vektor mit dem Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD) Promoter. Der Vektor besitzt einen 2-micron Replikationsursprung und liegt somit in hoher Kopienzahl (50-100 Kopien) in der Hefezelle vor. Eine Plasmidkarte des Vektors ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

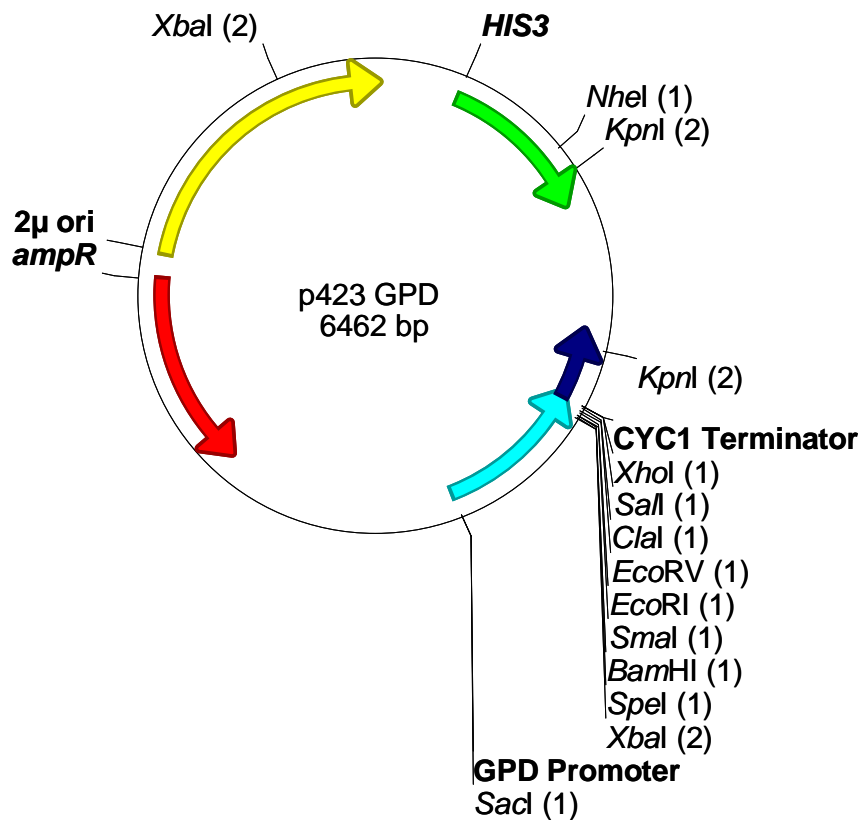


Abbildung 2.3 Plasmidkarte des Vektors p423GPD

2.1.6.5 pSGhAR

Das Gen des humanen Androgen-Rezeptors Isoform 1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bgl*II in pSG5 kloniert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Aria Baniahamad aus Jena zur Verfügung gestellt. Die Plasmidkarte ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

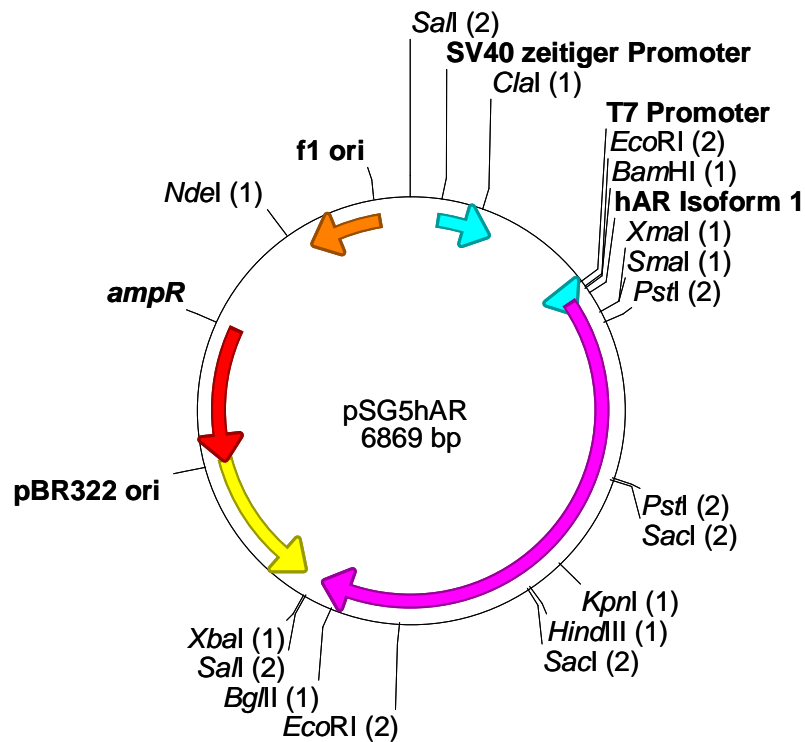


Abbildung 2.4 Plasmidkarte des Vektors pSG5hAR

2.1.6.6 pJR1-3XL (Moreno et al., 2000)

Dieses Plasmid liegt mit hoher Kopienzahl in der *S. pombe* Zelle vor. Es beinhaltet Sequenzen für die Replikation und Selektion (*ampR*) in *E. coli*, einen f1 Replikationsursprung (*ori*) für die Replikation im Phagen f1, einen Thiamin-repressiblen hoch effizienten *nmt1* Hefepromoter, eine *ars1* Sequenz für die Replikation in *S. pombe* und eine multiple Klonierungsstelle (MCS). Der Selektionsmarker für *S. pombe* ist Leucin.

2.1.6.7 pJR1-3XU (Moreno et al., 2000)

Das Plasmid pJR1-3XU ist wie das Plasmid pJR1-3XL aufgebaut, hat aber anstelle des Leucinmarkers einen Uracilmarker für die Selektion in *S. pombe*.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde in Luria-Bertani Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei ca. 200 Umdrehungen pro Minute (Upm) inkubiert. Um Transformanten zu selektieren wurde Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml Endkonzentration) zum Medium gegeben.

2.2.1.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Der Sumpster *S. cerevisiae* Stamm wurde in Glaxo Minimalmedium bei 30°C als Vorkultur ca. 24 Stunden kultiviert.

Die anderen *S. cerevisiae* Stämme wurden in YPD Kompletmedium über Nacht bei 30°C oder für die Selektion von Transformanten oder für Vorkulturen in W₀ Minimalmedium mit den entsprechenden Zusätzen bei 30°C bis zu mehrere Tagen inkubiert. Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei ca. 200 Upm inkubiert.

2.2.1.1.3 Kultivierung von *S. pombe*

S. pombe wurde in YEA Vollmedium über Nacht oder MML Minimalmedium ca. 24 Stunden bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei ca. 200 Upm inkubiert.

2.2.1.2 Bestimmung der Optischen Dichte (OD) von *S. cerevisiae*

Die Bestimmung der OD von *S. cerevisiae* erfolgte bei 690 nm am UV-Meter (Specord 200, Analytik Jena). Die Messung wurde in einer Küvette von ratiolab (1/2 Mikro Küvetten Nr. 1201) durchgeführt. Als Reverenz diente das jeweilige Medium ohne Zellen.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl von *S. cerevisiae* und *S. pombe*

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Es wurde eine 1:50 oder 1:100 Verdünnung in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) der Zellsuspension hergestellt und davon 10 µl in die Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden alle 4 Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

Zellzahl in Zellen/ml = (Zellen der Großquadrate/4) x Verdünnungsfaktor x 10.000

2.2.1.4 Kryokonservierung

2.2.1.4.1 Kryokonservierung von E. coli

E. coli mit den Ursprungs- oder konstruierten Plasmiden wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin kultiviert, abzentrifugiert (ca. 4000xg; 1 min), in 1 ml LB Medium mit 40% Glycerin aufgenommen, gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.4.2 Kryokonservierung von S. cerevisiae

S. cerevisiae mit den konstruierten Plasmiden wurde über Nacht in 5 ml Minimalmedium mit den entsprechenden Zusätzen kultiviert, abzentrifugiert (ca. 4000xg; 1 min), in 1 ml YPD Medium mit 40% Glycerin aufgenommen, gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

Der Sumpter Stamm wurde als 10-fach konzentrierte Suspension (OD₆₉₀=1 der Ausgangslösung) mit 15% Glycerin bei -20°C eingefroren.

2.2.1.4.3 Kryokonservierung von S. pombe

S. pombe mit den konstruierten Plasmiden wurden über Nacht in 5 ml Minimalmedium mit den entsprechenden Zusätzen kultiviert, abzentrifugiert (ca. 4000xg; 1 min), in 1 ml YEA Medium mit 40% Glycerin aufgenommen, gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.2 DNA-Methoden

2.2.2.1 DNA-Isolierung

2.2.2.1.1 Plasmid-Mini-Isolierung aus *E. coli*

Es wurden 3 ml LB-Medium mit Ampicillin mit einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Aus 2 ml dieser Übernachtskultur wurde mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben die Plasmid-Isolierung durchgeführt.

2.2.2.1.2 Plasmid-Midi-Isolierung aus *E. coli*

Die Plasmid-Midi-Isolierung wurde von 100 ml Hauptkultur mit dem Plasmid Midi Kit (100) von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt und in 300 µl eluiert.

2.2.2.1.3 Mini-Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* (Gietz und Woods, 2002)

Die Zellen einer Übernachtskultur wurden bei 3500 xg, 5 min geerntet. Das Pellet wurde mit 1 ml bidestilliertem Wasser gewaschen, in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl Lysepuffer aufgenommen. Es wurden ca. 400 µl Glasperlen (0,25 – 0,5 mm) zugefügt und die Zellen 2 Minuten mittels mechanischer Reibung aufgeschlossen. Die Glasperlen sedimentierten auf Eis in ca. 5 min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 275 µl 7 M Ammoniumacetat pH 7,0 gemischt. Die Lösung wurde 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Es wurden 500 µl Chloroform zugegeben, gründlich gemischt und bei 13000 xg 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol und 5-minütiger Inkubation bei RT gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (13000 xg, 5 min) pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend im Speedvac getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Lysepuffer

100 mM	Tris/HCl pH 8,0
50 mM	EDTA
1 %	Natriumdodecylsulfat (SDS)
in bidestilliertem Wasser	

2.2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Hefe wurde für 36 h bei 32°C und 65 Upm in 10 ml Minimal-Wachstumsmedium inkubiert und 30 Sekunden bei 300 xg pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Es wurden 0,3 g Glasperlen (0,25 – 0,5 mm) sowie 100 µl Phenol und 100 µl Chlorophorm-Isoamylalkohol (24:1) zugeben und für 2 min gut gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 16000 xg zentrifugiert, die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (NaAc) (82g/mol) und 2,5 Volumen Ethanol versetzt. Die Lösung wurde gut gemischt, mindestens 30 min bei -20°C oder 10 min bei -80°C inkubiert und 15 min bei 16000 xg zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 500 µl 70 %igem Ethanol. Anschließend wurde das Pellet kurz getrocknet und in 20 µl TE Puffer oder bidestilliertem Wasser aufgenommen. 10 µl der gelösten DNA wurden dialysiert und in *E. coli* DH10B transformiert.

Lysepuffer

10 mM	Tris/HCl pH 8.0 (121,14 g/mol)
1 mM	EDTA (FW 372,2)
100 mM	NaCl (58,44 g/mol)
1 %	SDS (288,38 g/mol)
2 %	Triton X-100
in bidestilliertem Wasser	

TE-Puffer

10 mM	Tris pH 8,0
1 mM	EDTA pH 8,0
in bidestilliertem Wasser	

2.2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde entweder am UV-Meter (Specord 200, Analytik Jena) oder am Nanodrop (PeqLab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

Für die Konzentrationsbestimmung am UV-Meter wurde eine 1:100 Verdünnung in 100 µl bidestilliertem Wasser hergestellt. Für die Messung wurde die Küvette 1000 verwendet. Die Absorption wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Referenz diente Wasser. Einer OD₂₆₀ von 1 entsprechen 50 ng/µl DNA. Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt die Reinheit der DNA an und sollte im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die Konzentrationsbestimmung am Nanodrop wurde laut Herstellerangaben mit 2 µl DNA-Lösung durchgeführt.

2.2.2.3 Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR

Zur Erstellung der Primer für die Amplifikation von Genen, Promotoren oder Sequenzkassetten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die 20 ersten bzw. 20 letzten Basenpaare der zu amplifizierenden Sequenz genommen und mittels Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) die *Annealing*temperaturen des *forward* und *reverse* Primers durch Weglassen oder Zugeben einer oder mehrerer Basen in der Sequenz angepasst. An das 5'-Ende jedes Primers wurde eine entsprechende Restriktionsschnittstelle angefügt und noch zusätzlich meist 6 beliebige Basen, für effektives Schneiden des Restriktionsenzym.

Die Primer wurden laut MWG 100 pmol/µl (100 µM) gelöst. Es wurde ein 10 µM Primer Mix hergestellt (10 µl Primer 1 + 10 µl Primer 2 + 80 µl Wasser) und für die PCR eingesetzt.

Für die Optimierung der PCR-Bedingungen wurde der Ansatz wie folgt pipettiert:

5 µl	10x PCR-Puffer ohne Mg ²⁺ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
1 µl	10 mM desoxy Nukleosidtriphosphate (dNTP) mix (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
1,5 µl	50 mM MgCl ₂ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
2,5 µl	Primer Mix 10 µM
1 µl	Template (Plasmid-Mini-Präparation 1:1000 verdünnt)
0,25 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
38,75 µl	Wasser

94°C 3 min
 94°C 45 sec
 T_a 30 sec $T_a = T_m - 5$ } 35x
 72°C 1 min/1 kilo Basen (kb)
 72°C 10 min
 4°C

Für die Amplifikation der Inserts für die Klonierung wurde eine *proofreading* Polymerase verwendet. Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

10 µl	10x Pfx Amplification Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
3 µl	10 mM dNTP Mix (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
2 µl	50 mM MgSO ₄ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
5 µl	Primer Mix 10 µM
2 µl	Template (Plasmid-Mini-Präparation 1:1000 verdünnt)
1 µl	Platinum Pfx DNA Polymerase (2,5 U/µl) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
77 µl	Wasser

94°C 2 min
 94°C 15 sec
 T_a 30 sec $T_a = T_m - 5$ } 35x
 72°C 1 min/1kb
 72°C 10 min
 4°C

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose Gel Elektrophorese getestet (5 µl), mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit von PeqLab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 µl eluiert.

2.2.2.4 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Der Restriktionsverdau wurde wie folgt angesetzt und bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur über Nacht inkubiert. Für die Klonierung wurden stets getrennte Verdau durchgeföhrt, nie ein Doppelverdau.

bis 6 µg DNA
10 µl 10x Puffer
1-2 µl Enzym
gegebenenfalls BSA
auf 100 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt

Ein Probe-Restriktionsverdau wurde wie folgt angesetzt und bei der durch den Hersteller angegebenen Temperatur für 2-3 Stunden inkubiert.

5 µl Plasmid-Mini-Präparation
2 µl 10x Puffer
0,2 µl Enzym
gegebenenfalls BSA
auf 20 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt

Die gesamten 20 µl wurden mit Ladepuffer versetzt und durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

2.2.2.5 Generierung stumpfer DNA-Enden

Die Generierung stumpfer DNA-Enden wurde genutzt, um 3'- oder 5'-überhängende Enden nach Restriktionsverdau zu entfernen. Dies ist notwendig, wenn die so geschnittene DNA mit einem DNA-Fragment ligiert werden soll, das mit einem Enzym geschnitten wurde, das stumpfe Enden generiert. Dafür wurde folgender Ansatz auf Eis pipettiert:

100 µl	Template
40 µl	T4 Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
1 µl	20 mM dNTPs (Endkonzentration 0,1 mM)
4 µl	T4 DNA Polymerase (5 U/µl) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
55 µl	Wasser

Der Ansatz wurde bei 11°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend mittels Ethanolfällung aufgereinigt.

2.2.2.6 Dephosphorylierung von geschnittenen Plasmiden

Um eine Religation von geschnittenem Vektor ohne Insert während der Klonierung zu verhindern, wurden geschnittene Vektoren dephosphoryliert. Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

1-5 µg	gereinigtes geschnittenes Plasmid
5 µl	10x Antarctic Phosphatase Puffer (New England BioLabs)
1 µl	Antarctic Phosphatase (5 U/µl) (New England BioLabs)
44 µl	bidestilliertes Wasser

Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 5 Minuten und eine Aufreinigung mit dem Gel Extraction Kit von PeqLab (Erlangen, Deutschland).

2.2.2.7 Aufreinigung von DNA

2.2.2.7.1 DNA-Aufreinigung mit dem Gel Extraction Kit von PeqLab

DNA aus PCR, Restriktionsverdau oder Dephosphorylierung wurde mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit von PeqLab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2.7.2 DNA-Aufreinigung mit Natriumacetatfällung

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 0,1 Volumenanteil 3 M Natriumacetat-Lösung und einem Volumenanteil Isopropanol versetzt und anschließend für 20 min bei -20°C zur Fällung inkubiert. Die gefällte DNA wurde danach bei 18000 xg, 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 18000 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in sterilem bidestilliertem Wasser gelöst.

2.2.2.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Um DNA-Fragmente zu trennen oder ihre Größe festzustellen wurde die Agarose-Gel-Elektrophorese verwendet. Die Agarose-Konzentration im Gel richtete sich nach der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente. Für Fragmente mit einer Größe zwischen 0,5 und 10 kb wurde ein 1 %iges Agarosegel in 1x TAE Puffer verwendet. Für Fragmente kleiner als 0,5 kb wurde ein 2 %iges Gel in 1x TAE Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x Ladepuffer) und auf das Gel aufgetragen. Um die Größe der Fragmente zu analysieren wurde zusätzlich 0,2 µg DNA Leiter aufgetragen.

6x Ladepuffer (Sambrook et al., 1998)

4 g Saccharose (40%)

1 Spatelspitze Bromphenolblau

1 Spatelspitze Xylencyanol

Der Ansatz wurde auf 10 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

50x TAE-Puffer

242g	Tris-HCl
57,1 ml	Eisessig
200 ml	0,25M EDTA pH 8,0

Die Substanzen wurden in ca. 700 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Agarosegel

Die Agarose wurde in 1x TAE durch aufkochen gelöst. 3 µl 1 %ige Etidium-Bromid (EtBr)-Lösung (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) wurden vor dem Gießen zu 100 ml Gel zugegeben.

2.2.2.9 DNA-Extraktion aus Agarose Gelen

Aus dem mit EtBr gefärbten Agarose Gel wurde die DNA aus der entsprechenden Bande mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit von PeqLab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2.10 Ligation

In einem Endvolumen von 10 µl wurden 100 ng Vektor, Insert im molekularen Verhältnis zum Vektor von 3:1 bis 10:1, 1 µl T4 DNA-Ligase-Puffer und 0,3 µl T4 DNA-Ligase (3 U/µl) von Promega (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert mitgeführt. Für die Transformation von *E. coli* wurde jeweils der gesamte Ansatz verwendet.

2.2.2.11 Transformation

2.2.2.11.1 Transformation von *E. coli*

Herstellung elektrokompeter *E. coli* Zellen

5 ml Vorkultur (LB Medium) wurde mit einer Einzelkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 320 ml LB Hauptkultur mit der Vorkultur 1:100 angeimpft und bei 37°C und 160 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 inkubiert (ca. 3h).

Je 160 ml der Hauptkultur wurden in zwei sterile Zentrifugationsröhrchen überführt und für 15-30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 xg und 4°C für 15 min. Die Pellets wurden in je 160 ml kaltem sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert und anschließend 10 min bei 4000 xg und 4°C erneut pelletiert. Die Pellets wurden in je 80 ml kaltem sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert und 10 min bei 4000 xg und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in je 4 ml 10 % sterilem Glycerol aufgenommen und abzentrifugiert (10 min, 4000 xg, 4°C). Die Pellets wurden in je 800 µl 10 % sterilem Glycerol aufgenommen, in 40 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

Dialyse

Eine VS-Membran (0,025 µm Porenweite von Millipore (Massachusetts, USA)) wurde mit der glänzenden Seite nach oben in eine mit sterilem Wasser gefüllte Petrischale gelegt. 5 µl Ligationsansatz bzw. Kontrolle wurden für 15 min auf die Membran gegeben.

Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die *E. coli* Zellsuspension wurde auf Eis aufgetaut. Zu den 40µl Zellsuspension wurden 1-5 µl Plasmid-DNA geben und gut gemischt. Es wurde 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde in einer Elektroporationsküvette (maximal 80µl) mit einem Plattenabstand von 0,1 cm (PeqLab, Erlangen, Deutschland) mit dem Gene Pulser II (BIO-RAD, München, Deutschland) und einem Impuls von 1,8 kV, 25 µF, 200 Ω, 4,5 bis 5,0 ms durchgeführt. Die Zellen wurden in 1 ml SOC Medium aufgenommen, 1 h bei 37°C inkubiert, auf LB Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgespatelt und bei 37°C über Nacht kultiviert.

SOC-Medium (Sambrook et al., 1998)

2 %	Trypton/Pepton
0,5 %	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
20 mM	Glucose
in bidestilliertem Wasser	

Der Ansatz wurde auf 100 ml aufgefüllt, in 10 ml aliquotiert, autoklaviert und bei -20°C eingefroren.

Waschen der Küvetten

Die Küvetten wurden zum Reinigen einen Tag in 70 % Ethanol, einen Tag in 1 % Essigsäure, einen Tag in bidestilliertem Wasser und erneut einen Tag in 70% Ethanol gelegt und anschließend im Trockenschrank bei 80°C getrocknet.

2.2.2.11.2 Transformation von *S. cerevisiae* und *S. pombe* (Ito et al., 1983; Schiestl und Gietz, 1989)

Der zu transformierende Hefestamm wurde über Nacht bei 30°C auf einer entsprechenden Agarplatte kultiviert. Von dieser Platte wurden Zellen abgenommen und in 1ml sterilem Wasser gelöst. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 3500 xg. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung 1 aufgenommen. Ca. 250 ng Plasmid und 5 µl Lachsspermien-DNA, die zuvor 5 min auf 95°C erhitzt wurde (10 mg/ml), wurden zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Schließlich wurden 0,6 ml Lösung 2 zugegeben und gemischt. Es folgte ein zweiter Inkubationsschritt bei 42°C für 30 Minuten. Die Zellen wurden bei 16000 xg für 2 Minuten zentrifugiert, mit 600 µl sterilem Wasser gewaschen und auf Minimalmedium mit den entsprechenden Aminosäuren oder Nukleobasen ausgespatelt.

Lösung 1

1 mM EDTA pH 8
0,1 M Lithiumacetat (LiAc)
10 mM Tris -HCl pH 8
in bidestilliertem Wasser

Lösung 2

1 mM EDTA pH 8
0,1 M LiAc
40 % PEG₄₀₀₀
10 mM Tris -HCl pH 8
in bidestilliertem Wasser

2.2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma MWG als *Single Value Read* durchgeführt.

2.2.2.13 Klonierung

Zuerst wurde stets das zu klonierende Gen mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden ungefähr die ersten und letzten 20 Basenpaare (bp) des zu klonierenden Gens verwendet und die *Annealing*-Temperatur des Primerpaares durch Weglassen oder Hinzufügen von Basen angeglichen. Bei der PCR wurden am 3'- und 5'-Ende entsprechende Schnittstellen für Restriktionsenzyme angefügt. Als DNA-Polymerase wurde eine *proofreading* Polymerase verwendet. Dadurch wurde die Fehlerrate bei der Amplifikation möglichst klein gehalten. Zur Überprüfung des PCR- Produkts auf seine Spezifität, wurde ein kleiner Teil des PCR-Ansatzes mittels Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt. Als Marker wurde die 1 kb DNA- Leiter verwendet. Bei gelungener Amplifikation wurde das PCR-Produkt mit dem Gel Extraction Kit von PeqLab (Erlangen, Deutschland) gereinigt.

Das gereinigte PCR-Produkt und der Vektor wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Zwischen den beiden Verdauen wurden jeweils beide Ansätze aufgereinigt. Anschließend wurden der Vektor und das PCR- Produkt mittels Gelelektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Aus dem Gel wurden die spezifischen Fragmente ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA wurde aus dem Agarosegelstück extrahiert.

Dadurch konnten unspezifische Produkte im PCR-Ansatz und ungeschnittene Vektoren (zirkuläre, *supercoiled* Topologie) abgetrennt werden. Somit wurde die Wahrscheinlichkeit für den Einbau von unspezifischen Insertfragmenten während der Ligation und die Transformation eines Vektors ohne Insert minimiert. Außerdem wurde der geschnittene Vektor dephosphoryliert, um eine Ligation ohne Insert zu verhindern. Um störende Salze, welche die Ligation behindern könnten, aus dem Eluat von Vektor und Insert zu entfernen, wurden beide Proben mittels einer Natriumacetat- Fällung gereinigt. Anschließend folgte die Ligation.

Vor der Transformation in *E. coli* DH10B wurden die Ligationsansätze dialysiert. Anschließend wurden der ligierte Vektor und als Negativkontrolle nur ligierter, geschnittener Vektor ohne Insert in *E. coli* DH10B durch Elektroporation eingebracht. Die Elektroporationsansätze wurden auf LB- Mediumplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Transformation verlief erfolgreich, wenn auf der Negativkontrolle nur wenige Kolonien wuchsen und auf der Probenplatte zahlreiche Transformanden zu erkennen waren.

Zur Überprüfung der Transformanden wurde von ausgewählten Kolonien die Plasmid-DNA mittels Mini-Plasmidpräparation gewonnen und zur Kontrolle mit einem oder mehreren geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Als Negativkontrollen wurde der Vektor ohne Insert verdaut und ein Reaktionsmix ohne DNA mitgeführt.

Alle Ansätze wurden elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt um positive Klone zu identifizieren. Dabei wurde der 1 kb DNA-Größenstandard verwendet. Zur Verifizierung wurde die DNA eines positiven Klons zur Sequenzierung an MWG geschickt.

2.2.3 Protein-Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion aus Hefezellen mit Y-PER

5 ml Flüssigmedium wurden mit dem jeweiligen Hefestamm angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Portionen aliquotiert und für 5 min bei 3000 xg bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Gewicht des Pellets bestimmt. Dementsprechend wurde eine Menge an Y-PER-Reagenz zum Pellet gegeben (siehe Herstellerangaben). Die Ansätze wurden gut gemischt und für 20 min bei RT und 900 Upm geschüttelt (Thermomixer von Eppendorf). Danach wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (10 min, 14000 xg) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Herstellung der Gele für die SDS-PAGE

Die Gelansätze wurden zunächst ohne Zugabe von TEMED hergestellt. Erst kurz vor dem Gießen wurde die Polymerisation mit TEMED eingeleitet. Das Trenngel wurde gegossen, mit Isopropanol überschichtet und 30 min bei RT zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Das Isopropanol wurde entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nachdem der Kamm eingesetzt wurde, konnte das Gel 30 min auspolymerisieren. Danach wurde der Kamm entfernt und die Gelkassette in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Trenngelpuffer, 4x

1,5 M Tris
0,4 % SDS
in bidestilliertem Wasser

Sammelgelpuffer, 4x

0,5 M Tris
0,4 % SDS
in bidestilliertem Wasser

Sammelgel (4,5 %)

Trenngel (6 %)

0,75 ml	---	4 x Sammelgelpuffer
---	2,5 ml	4 x Trenngelpuffer
0,45 ml	2 ml	Rotiphorese® Gel 30
0,075 ml	0,25 ml	4 % Ammoniumpersulfat (APS) – Lösung
3 µl	10 µl	TEMED
1,725 ml	5,25 ml	Wasser
3 ml	10 ml	Gesamtvolumen

Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese

Zum 6x SDS-Probenpuffer wurde 5 % β -Mercaptoethanol zugegeben. Die Probe wurde mit Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert, um Volumenverluste durch aufgestiegenes Kondenswasser zu verhindern.

SDS-Probenpuffer 6x

0,25 M Tris
36 % Glycerin
0,357 M SDS
0,05 % Bromphenolblau
in bidestilliertem Wasser

SDS-Gelelektrophorese

Vor dem Probenauftrag wurde die Kammer zwischen den Gelen mit Elektrophoresepuffer gefüllt, die Kämme gezogen und die Taschen gespült. Wenn möglich wurden ca. 20 μ g Protein in ca. 30 μ l Volumen und der Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die äußere Kammer des Elektrophoresegerätes wurde ebenfalls ungefähr bis zu einem Drittel mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Die Proteine wurden ca. 15 min bei 80 V (bis zum Erreichen der Trenngelgrenze) und anschließend ca. 1 h bei 100 V getrennt.

10 x Elektrophoresepuffer

0,25 M Tris
1,92 M Glycerin
in bidestilliertem Wasser

1 x Elektrophoresepuffer

10 % 10 x Elektrophoresepuffer
1 % 10 % SDS
in bidestilliertem Wasser

2.2.3.3 Western Blot

Zum Blotten wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore (Massachusetts, USA); 0,45 µm) verwendet. Die Membran wurde zunächst für 5 min in 100 % Methanol aktiviert und das Filterpapier (Extra Thick Blot Paper PROTEAN II xi size, BIO-RAD, München, Deutschland) mit Transferpuffer getränkt. Der Blotaufbau wurde wie folgt realisiert:

ein dickes Filterpapier (oben)

Gel

PVDF-Membran

ein dickes Filterpapier (unten)

Der elektrische Transfer der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 2 h. Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran feucht in Folie eingeschweißt und die Detektion mit spezifischen Antikörpern unmittelbar angeschlossen.

Transferpuffer

10 % 10x Elektrophoresepuffer

1 % 10 % SDS-Lösung

10 % 100 % Methanol

in bidestilliertem Wasser

2.2.3.4 Immunfärbung

Die proteinbeladene PVDF-Membran wurde für eine Stunde bei RT mit 10 ml Blockpuffer unter Schütteln inkubiert. Der Blockpuffer wurde verworfen und 10 ml frischer Blockpuffer mit Primärantikörper in entsprechender Verdünnung wurde zugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C unter Schütteln. Am Morgen wurde die Inkubationslösung entfernt (kann wieder verwendet werden) und die PVDF-Membran 3x 10 min mit Phosphat-gepufferter Saline mit Tween 20 (PBST) gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei RT unter Schütteln mit 10 ml Sekundärantikörper in Blockpuffer in entsprechender Verdünnung. Anschließend wurde die PVDF-Membran erneut 3x 10 min mit PBST gewaschen.

Die Immunodetektion erfolgte mit ECL-Lösung (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien). Als Vorbereitung wurde in der Dunkelkammer der Film in der Größe des Blots zugeschnitten und der Entwickler/Fixierer in die Schalen gefüllt. Die ECL-Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:40 gemischt und bis zur Inkubation vor Licht geschützt aufbewahrt.

Die PVDF-Membran wurde in eine Folie gelegt und mit 1 ml ECL-Reagenz für 5 min inkubiert. Danach wurde das ECL-Reagenz entfernt und die Membran in einer neuen Folie in eine X-Ray-Filmkassette eingelegt. Auf die Oberseite der Membran wurde ein Autoradiographiefilm positioniert und bei entsprechender Expositionszeit (30s, 1 min, 2 min,... bis zu 1 h möglich) inkubiert. Anschließend wurde der Film mit Entwicklerlösung und Fixierlösung entwickelt. Dabei ist zu beachten, dass der Film vor und nach dem Eintauchen in die Fixierlösung mit Wasser gewaschen wurde um Rückstände zu entfernen. Nach der Trocknung erfolgte die Auswertung der Banden durch Größenabgleich mit dem sichtbaren Standard auf der Membran.

Phosphat-gepufferte Saline mit Tween 20, PBST

80 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
20 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
100 mM	NaCl
0,1 %	Tween 20
in bidestilliertem Wasser	

Blockpuffer

5 %	Magermilchpulver in PBST
-----	--------------------------

Antikörper

Primärer Antikörper

Kaninchen anti-AR (C-19), Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland), Aliquots bei 4°C, Verdünnung 1:250

Sekundärer Antikörper

Ziege anti-Kaninchen Meerrettichperoxidase (HRPO) (Goat Anti-Rabbit), Dianova (Hamburg, Deutschland), Aliquots bei -80°C, Verdünnung 1:10000

2.2.4 Urinaufarbeitung

2.2.4.1 Etherextraktion von Urinproben

Je 1 ml Urin wurde in ein Schliffstopfen-Röhrchen gegeben und 4 ml destillierter Diethylether hinzugefügt. Die Röhrchen wurden sorgfältig mit dem Stopfen verschlossen und 2 x 1 min sorgfältig gemischt. Anschließend wurden die Röhrchen für 20 min bei 840 xg zentrifugiert und dann für ca. 3 min in ein Methanol-Trockeneisgemisch gestellt, bis die wässrige Phase gefroren war. Sollten sich Kristalle in der Etherphase gebildet haben, wurden diese vor dem nächsten Schritt aufgetaut. Die Etherphase wurde in ein neues Glasröhrchen überführt und im Heizblock bei 40°C unter Bedampfung mit Stickstoff eingedampft. Die Wand des Glasröhrchens wurde mit 1 ml abs. Ethanol gespült und die Probe erneut vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl Medium gelöst. Durch diese Behandlung wurden die Inhaltsstoffe des Urins zehnfach konzentriert.

2.2.4.2 Urinreinigung mit Säulen

Die Urinreinigung wurde mit Festphasenextraktions-Säulen von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden für die Reinigung von 2 ml Urinprobe je eine Chromabond Säule C18, beladen mit Octadecyl-modifiziertem Kieselgel und eine Chromabond Säule NH₂, beladen mit Aminopropyl-modifiziertem Kieselgel verwendet. Zuerst wurden die Urinproben hydrolysiert. Dafür wurden 2 ml Urin in einem 14 ml Glaskolben auf einen pH von 4,8 mit NaOH bzw. Essigsäure eingestellt. Es wurden 25 µl einer 1:10 Verdünnung Glucoronidase/arylsulfatase (stabilisierte wässrige Lösung von Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,25 M, pH 4,8 Natrium-Acetatpuffer zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Probe auf RT abgekühlt, mit 2 ml Natrium-Acetatpuffer (0,25 M, pH 4,8) verdünnt und die C18 Säule mit 3 ml Methanol und 3 ml Natrium-Acetatpuffer (0,25 M, pH 4,8) kalibriert. Die verdünnte Urinprobe wurde aufgetragen und die Säule nacheinander mit 1,5 ml Na₂CO₃ Puffer (100 g/l), 3 ml Wasser, 1,5 ml Natrium-Acetatpuffer (0,25 M, pH 4,8), 3 ml Wasser und 2 ml 50 % Methanol (in Wasser) unter angelegtem Vakuum gewaschen. Die Säule wurde 5 min unter angelegtem Vakuum getrocknet und schließlich mit 4 ml Methanol eluiert. Der Extrakt wurde auf die mit 3 ml Methanol kalibrierte NH₂ Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen, unter 45°C warmen Stickstoff vollständig abgedampft und in 100 µl Hefemedium aufgenommen. Durch diese Behandlung wurden die Inhaltsstoffe des Urins zwanzigfach konzentriert.

2.2.5 Reporter-Gen Assays in der Hefe

2.2.5.1 Hefeassay mit den Sumpter *lacZ*-Hefestämmen

Eine aufgetaute Hefe-Stammkultur wurde als Übernachtskultur in 26 ml Wachstumsmedium bei 30°C für 24 h unter Schütteln (200 Upm) angezogen. Am nächsten Tag wurde Glaxo Testmedium für eine entsprechende Plattenanzahl hergestellt.

In die *wells* der 96-Mikrotiterplatten (Zellkultur Testplatte 96F von TPP) wurden jeweils 2 µl der in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelösten Substanz (4-facher Ansatz) pipettiert. Je Ansatz wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente DHT in Endkonzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-5} M. Als Negativkontrolle wurde DMSO verwendet. Je *well* wurden 200 µl des Glaxo Testmediums zupipettiert und bei 30°C und 65 Upm zwei Tage inkubiert. Für einen antiandrogenen Testansatz wurde dem Glaxo Testmedium 10^{-8} M DHT zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Färbung bei 565 nm und die Trübung bei 690 nm am Plattenphotometer infinite F200 (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die gemessene OD der Trübung wurde von der OD der Färbung subtrahiert und die Mittelwerte der 4-fach-Bestimmung ermittelt. Es wurden je drei unabhängige Experimente pro Substanz durchgeführt. Jedes unabhängige Experiment wurde gegen den Wert von 10^{-8} M DHT (Wert wurde 1 gesetzt) normalisiert und der Mittelwert mit Standardabweichung der drei unabhängigen Versuche berechnet. Eine Signifikanzanalyse wurde unter Berufung auf den Biostatistiker Dr. Matthias Rudolf (Institut für Allgemeine Psychologie, Biopsychologie und Methoden der Psychologie der TU Dresden) wegen eines zu geringen Stichprobenumfangs von nur drei unabhängigen Experimenten nicht durchgeführt.

2.2.5.2 Hefeassay mit den EGFP *S. cerevisiae* oder *S. pombe* Hefestämmen

Für den androgenen Assay wurde 1 µl der zu untersuchenden Substanz, gelöst in DMSO, als Vierfachbestimmung in eine unbehandelte sterile schwarze 96-Mikrotiterplatte mit transparentem F-Boden von BRAND pipettiert. DMSO wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Für den antiandrogenen Testansatz wurde zusätzlich direkt zum Medium 10^{-8} M DHT beim *S. cerevisiae* Assay und 5×10^{-8} M DHT beim *S. pombe* Assay zugegeben. Jedes Experiment erfolgte in drei unabhängigen Wiederholungen.

In w_0 Medium für *S. cerevisiae* oder MML Medium für *S. pombe* wurde eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml mit einer Vorkultur (30°C, 200 Upm, 24 h bei *S. pombe*, 16 h bei *S. cerevisiae*) eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden zu jedem *well* der Platte

gegeben. Die Platte wurde bei 30°C für 24 h inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenz (485 nm Exzitation, 535 nm Emission) und die Optische Dichte bei 690 nm im Plattenphotometer infinite F200 (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Zur Standardisierung wurde der Fluoreszenzwert durch die Optische Dichte geteilt. Jedes unabhängige Experiment wurde gegen den Wert von 10^{-8} M DHT (Wert wurde 1 gesetzt) normalisiert und der Mittelwert mit Standardabweichung der drei unabhängigen Versuche berechnet. Eine Signifikanzanalyse wurde unter Berufung auf den Biostatistiker Dr. Matthias Rudolf (Institut für Allgemeine Psychologie, Biopsychologie und Methoden der Psychologie der TU Dresden) wegen eines zu geringen Stichprobenumfangs von nur drei unabhängigen Experimenten nicht durchgeführt.

2.2.5.3 Bestimmung des EC50 Wertes

Der EC50 wurde mit dem Programm SigmaPlot 9.0 bestimmt.

2.2.6 Ausscheidungsversuche

Alle Ausscheidungsversuche wurden unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. Unmittelbar bei Substanzeinnahme wurde die Referenz-Urinprobe abgegeben. Danach wurden alle Urinproben ohne zeitliche Vorgabe und ohne Berücksichtigung von Flüssigkeits- oder Nahrungsaufnahme über einen bestimmten Zeitraum gesammelt. Die Urinproben der Ausscheidungsversuche wurden ebenfalls in drei unabhängigen Experimenten in den Hefeassays getestet.

2.2.6.1 Trenbolox-Ausscheidungsversuch

Nachdem ein Freiwilliger (männlich, 66 Jahre, 85 kg) eine Kapsel Trenbolox (hergestellt von PharmLabs; vertrieben von DSP, Wilmington, USA) entsprechend ca. 25 mg Estra-4,9-dien-3,17-dion oral einnahm, wurden die Urinproben über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt. Dabei wurde unmittelbar nach der Einnahme von Trenbolox die Urinprobe Trenbolox 0 abgegeben. Die entsprechenden Urinproben wurden vom Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln zur Verfügung gestellt. Die Urinproben wurden 1:10, 1:100 und 1:1000 in PBS verdünnt. Vom unverdünnten Urin und gegebenenfalls den Verdünnungen wurden jeweils 40 µl in 160 µl Hefemedium für den Sumpter Assay und

10 µl in 90 µl Hefemedium für die konstruierten Hefeassays gegeben. Somit wurden in die Hefeassays 20 % bzw. 10 % Urin des Trenbolox-Ausscheidungsversuchs eingesetzt.

2.2.6.2 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch

Ein Freiwilliger (männlich, 52 Jahre) nahm 5 mg Methyltestosteron oral ein. Urinproben wurden von null bis 307 Stunden nach Methyltestosteron-Einnahme gesammelt und vom Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln zur Verfügung gestellt. Von den Urinproben wurden jeweils 40 µl in 160 µl Hefemedium für den Sumpter Assay und 10 µl in 90 µl Hefemedium für die konstruierten Hefeassays eingesetzt.

2.2.6.3 1-Androsteron- Ausscheidungsversuch

In den konstruierten Hefeassays wurden Urinproben eines 1-Androsteron-Ausscheidungsversuches getestet. Die Urinproben wurden vom Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln zur Verfügung gestellt. Ein Freiwilliger (männlich, 68 Jahre, 85 kg) nahm eine Kapsel entsprechend ca. 115 mg 1-Androsteron (3β-hydroxy-5α-androst-1-en-17-on) oral ein, woraufhin die Urinproben über einen Zeitraum von 12,5 Tagen (300 h) gesammelt wurden. Dabei wurde kurz vor der Einnahme von 1-Androsteron die Urinprobe 0 als Referenzprobe abgegeben. Von den Urinproben wurden jeweils 10 µl in 90 µl Hefemedium bei den konstruierten Hefeassays eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und genetische Veränderung des Sumpter Hefeassays (Sohoni und Sumpter, 1998)

3.1.1 Hefeassays mit dem original Sumpter Stamm

Um den Hefeassay von Roudledge und Sumpter näher zu charakterisieren und seine Nutzbarkeit für den Nachweis der Aktivität von Dopingsubstanzen zu testen, wurden eine Reihe verschiedener Substanzen eingesetzt. Zum einen wurden Dopingsubstanzen und deren Hauptmetabolite getestet. Außerdem wurden verschiedene nicht-androgene Steroide eingesetzt, um die Spezifität des Testsystems für Androgene zu überprüfen. Da in der klassischen Dopinganalyse zum Nachweis anaboler androgener Substanzen Urinproben untersucht werden, wurden in dieser Arbeit auch die Toleranz des Hefeassays gegenüber Urin sowie die Nachweisbarkeit der Aktivität von androgenen Substanzen im Urin getestet.

3.1.1.1 Dopingsubstanzen und deren Metabolite im Sumpter Hefeassay

Vom Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln wurden eine Reihe Dopingsubstanzen (Boldenon, Mesterolone, Metandienon, Metenolon, Nandrolon, Oxandrolon, Stanozolol) und deren Metabolite zum Testen zur Verfügung gestellt. Bei den Metaboliten handelte es sich jeweils um den Hauptmetaboliten M1, abgesehen von Metandienon, von welchem die Metaboliten M2, M3 und M4 geprüft wurden. Außerdem wurde von Nandrolon noch der Metabolit M2 und von Stanozolol die Metaboliten M3 und M4 untersucht. Die Substanzen wurden jeweils in den Konzentrationen 10^{-11} oder 10^{-10} M bis 10^{-5} bzw. 10^{-4} M im Hefetest eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

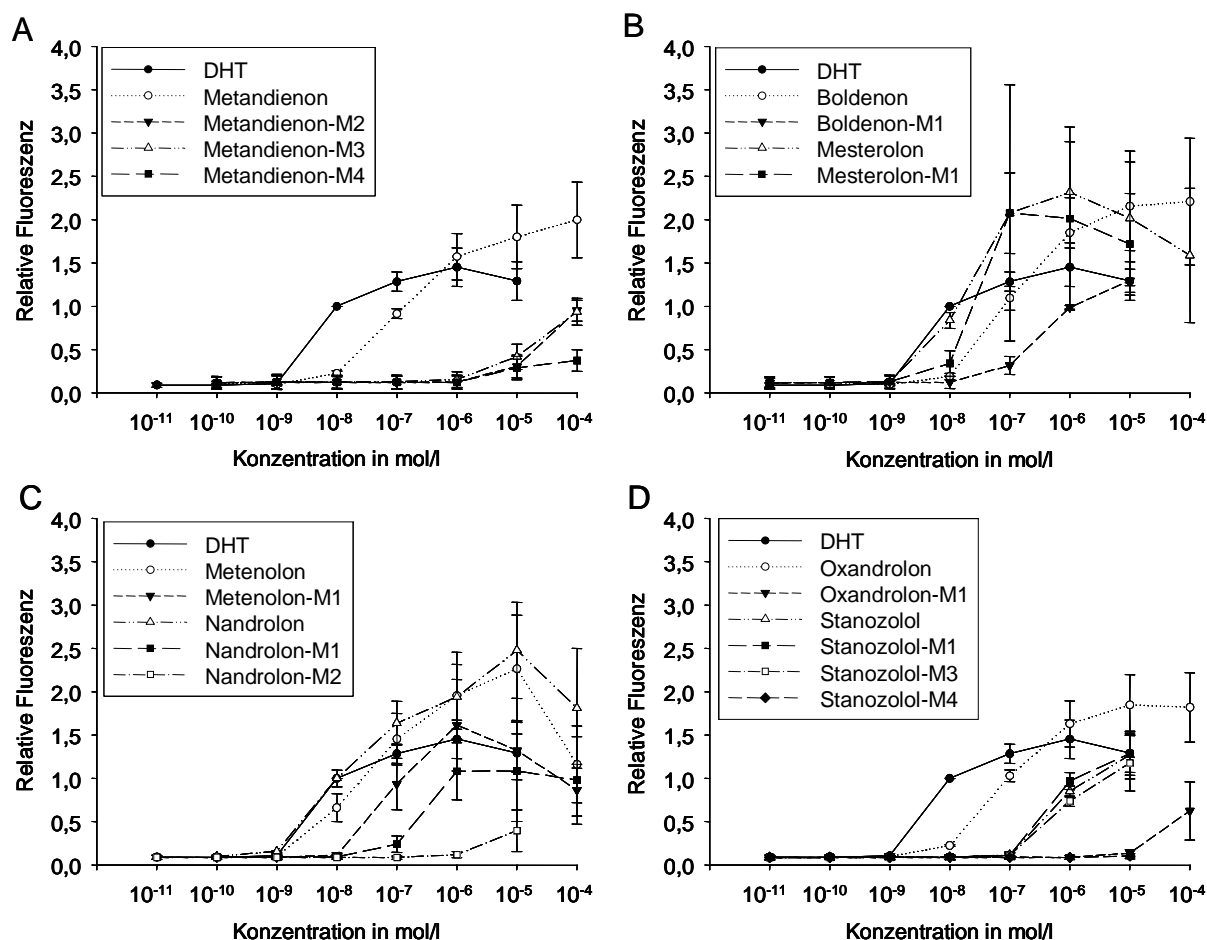


Abbildung 3.1 Konzentrations-Wirkungskurven von Dopingsubstanzen und deren Metabolite im Sumpter Hefeassay. Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungskurven von Metandienon (A), Boldenon, Mesterolone (B), Metenolon, Nandrolon (C), Oxandrolon, Stanozolol (D) und deren Metabolite. DHT wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

Boldenon und sein Hauptmetabolit M1 (Abbildung 3.1 B) zeigten ab einer Konzentration von 10^{-7} M eine Wirkung im Hefeassay, wobei die Konzentrations-Wirkungskurve des Metaboliten flacher verläuft als die von Boldenon. Mesterolone und sein Hauptmetabolit M1 zeigten bereits ab einer Konzentration von 10^{-8} M einen Effekt im Hefeassay (Abbildung 3.1 B). Von Metenolon und Nandrolon konnte ebenfalls ein Effekt ab einer Konzentration von 10^{-8} M und bei deren Hauptmetaboliten M1 ab einer Konzentration von 10^{-7} M nachgewiesen werden (Abbildung 3.1 C). Der Metabolit M2 von Nandrolon zeigte eine Wirkung ab einer Konzentration von 10^{-5} M. Obwohl die Ausgangssubstanzen Metandienon (Abbildung 3.1 A) und Oxandrolon (Abbildung 3.1 D) bereits ab einer Konzentration von 10^{-8} M eine Wirkung im Hefeassay hervorgerufen haben, zeigten die Metabolite von Metandienon, M2, M3 und M4, erst ab einer Konzentration von 10^{-5} M und der Metabolit Oxandrolon M1 bei einer Konzentration von 10^{-4} M eine Wirkung. Stanozolol als Reinsubstanz zeigte, wie seine

Metaboliten M1 und M3, eine Wirkung ab einer Konzentration von 10^{-6} M im Hefeassay (Abbildung 3.1 D). Für den Metaboliten M4 konnte bis zu einer Konzentration von 10^{-5} M kein Effekt gezeigt werden.

3.1.1.2 Nicht-androgene Steroide und DHEA im Sumpter Hefeassay

Um die Spezifität des Sumpter Hefeassays zu testen, wurden die natürlich vorkommenden nicht-androgenen Steroidhormone Aldosteron (Mineralocorticoid), 17β -Östradiol (Östrogen), Progesteron (Gestagen) und das künstliche Glucocorticoid Dexamethason im Hefeassay eingesetzt. Außerdem wurde das Prohormon Dehydroepiandrosteron (DHEA), eine Vorstufe in der Steroidbiosynthese unter anderem für Testosteron, getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

Aldosteron und Dexamethason zeigten bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M keine Wirkung im Hefeassay. Progesteron und 17β -Östradiol zeigten ab einer Konzentration von 10^{-7} M und Dehydroepiandrosteron ab einer Konzentration von 10^{-6} M einen Effekt.

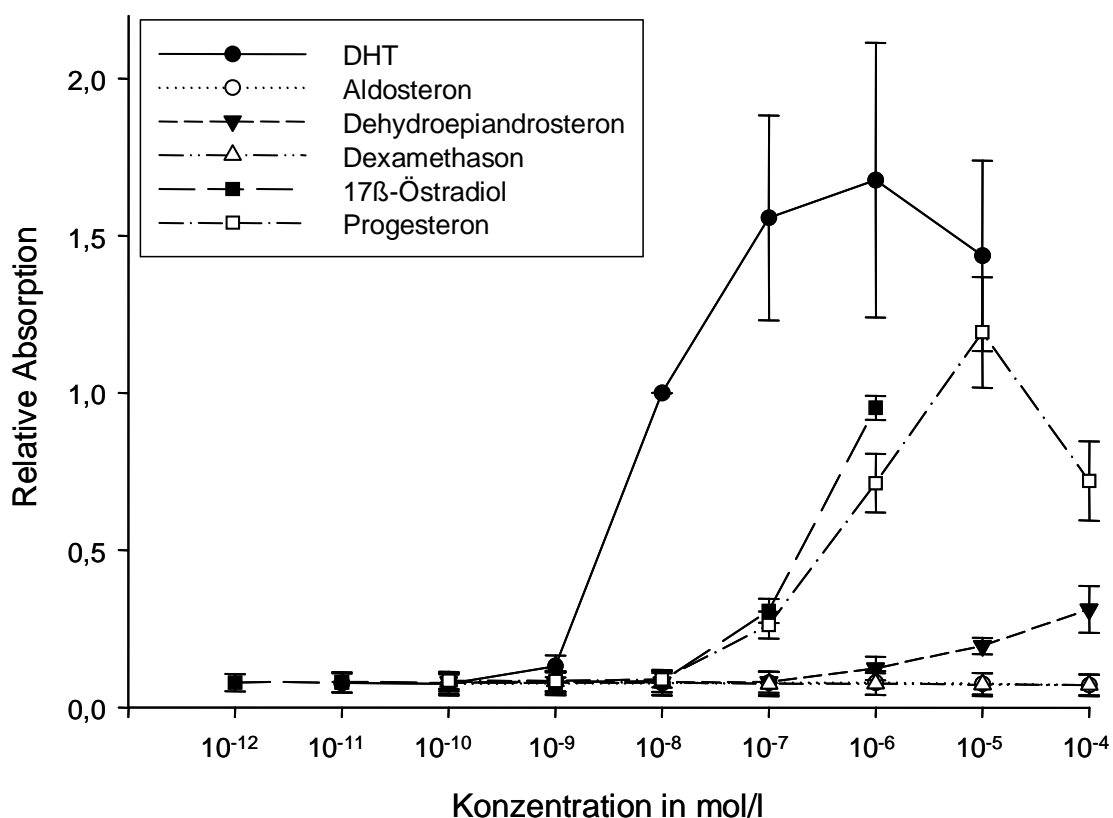


Abbildung 3.2 Konzentrations-Wirkungskurven von nicht-androgenen Steroiden und DHEA im Sumpter Hefeassay. Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungskurven von Aldosteron, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dexamethason, 17β - Östradiol und Progesteron. DHT wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

3.1.1.3 Urinproben von Frauen und Männern im Sumpter Hefeassay

In weiteren Tests wurden Urinproben von zwei schwangeren Frauen (33 bzw. 39 Jahre), nicht-schwangeren Frauen (20 bis 45 Jahre) und Männern (20 bis 45 Jahre) im Hefeassay verglichen. Abgesehen von der Urinprobe einer Probandin schwarzafrikanischer Abstammung (Urinprobe 7w), stammten sämtliche weiteren Urinproben von Probanden weißer Hautfarbe. Eine zusätzliche Charakterisierung der Urinproben wurde nicht durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde DHT in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M ohne Zusatz von Urin mitgeführt. Die Ergebnisse der Urinproben schwangerer Frauen sind in Abbildung 3.3 A gezeigt. Der Urin schwangerer Frauen, in dem physiologisch die höchste Urin-Progesteronkonzentration enthalten sein sollte, zeigte bis zu einer Konzentration von 20 % Urin im Hefemedium keine Wirkung im Hefeassay.

Um den Einfluss von natürlich vorkommendem 17β -Östradiol in Urinproben von Frauen und Testosteron im Urin von Männern bzw. deren Derivate im Hefeassay zu untersuchen, wurden Urinproben von Männern und Frauen im Test eingesetzt (Abbildung 3.3 B). Dabei zeigte nur die Urinprobe 7w eine schwache Konzentrations-Wirkungskurve. Eine weitere getestete Urinprobe dieser Probandin zeigte jedoch nicht mehr solch einen Kurvenverlauf (Daten nicht gezeigt). In allen weiteren Urinproben wurde kein bedeutender Anstieg des Signals bis zu einer Urinkonzentration von 20 % im Hefemedium festgestellt.

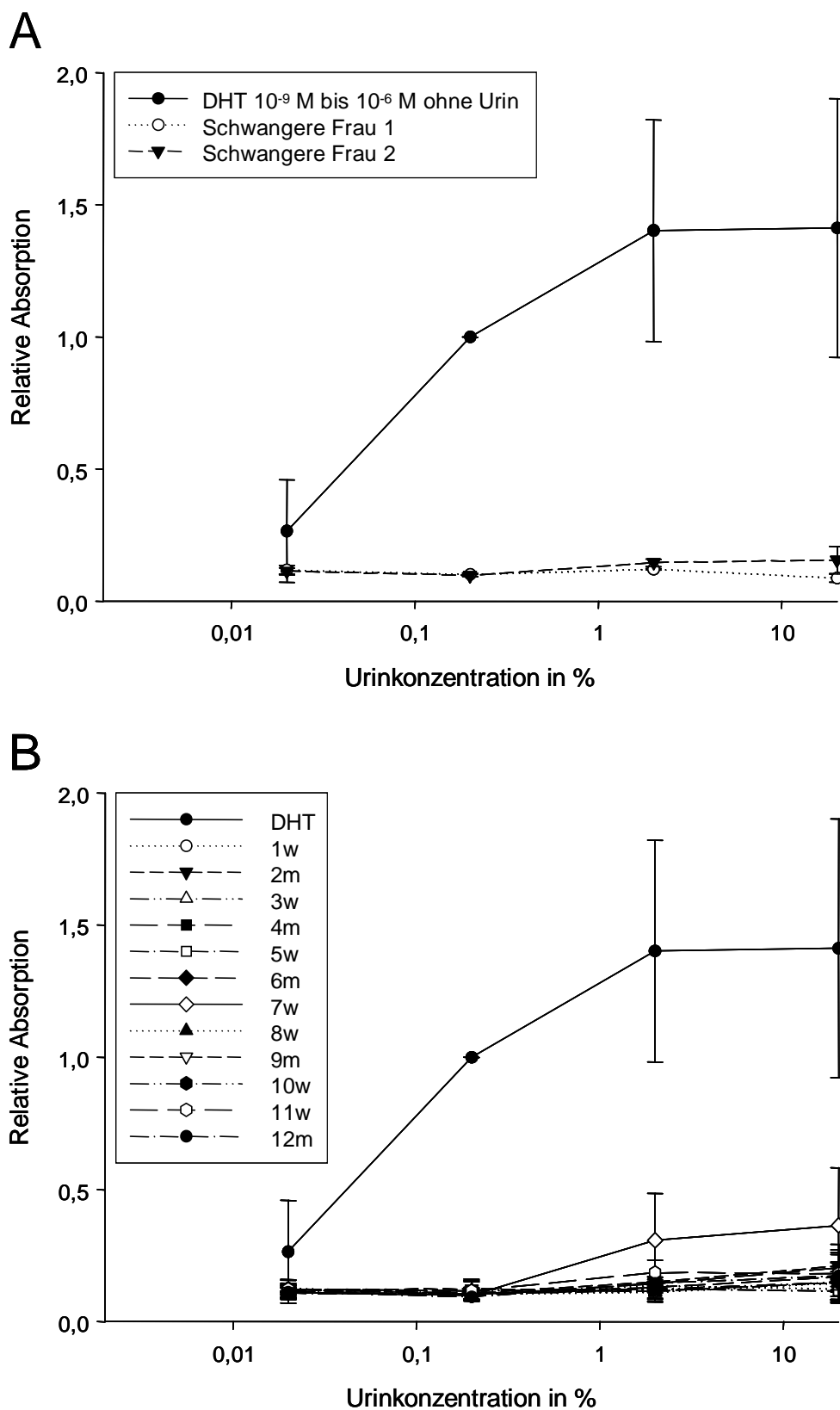


Abbildung 3.3 Konzentrations-Wirkungskurven von Urinproben schwangerer Frauen (A), nicht-schwangerer Frauen und Männern (B) im Sumpter Hefeassay. DHT wurde als Positivkontrolle in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M ohne Zugabe von Urin mitgeführt.

3.1.1.4 Trenbolox-Ausscheidungsversuch im Sumpter Hefeassay

Im Sumpter Hefeassay wurde ein Trenbolox-Ausscheidungsversuch getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

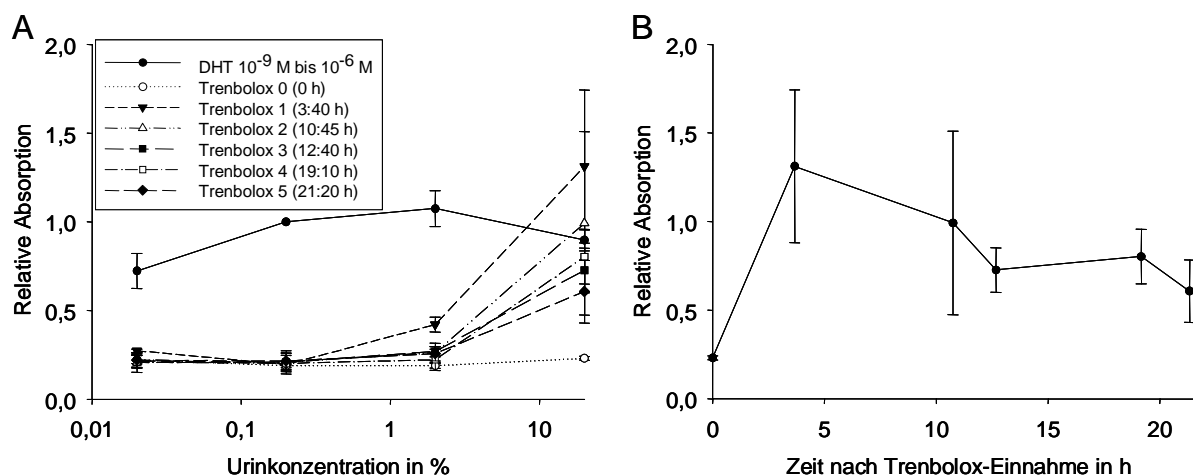


Abbildung 3.4 Konzentrations-Wirkungskurven (A) und Zeit-Wirkungskurve (B) des Trenbolox-Ausscheidungsversuchs im Sumpter Hefeassay. In Abbildung A ist die Zeit der Urinabgabe in h nach der Einnahme von einer Kapsel Trenbolox entsprechend ca. 25 mg Estra-4,9-dien-3,17-dion nach dem Probennamen angegeben. DHT wurde als Positivkontrolle in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} M in 20 % Sammelurin mitgeführt (A). In Abbildung B wurde die relative Absorption der Proben in der höchsten Urinkonzentration von 20 % in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.

Die Referenzprobe Trenbolox 0 zeigte, wie zu erwarten, im Hefeassay bis zu einer Konzentration von 20 % Urin im Hefenmedium keinen Effekt. Alle fünf nach der Einnahme von Trenbolox gewonnenen Urinproben (Trenbolox 1 bis 5) zeigten einen deutlichen Anstieg der Absorption bei einer Urinkonzentration von 20 % im Hefemedium. Nach einem Signalmaximum bei 3:40 Stunden nach Substanzaufnahme geht die Signalintensität zurück, wobei allerdings die Urinprobe nach 19:10 Stunden nach Substanzaufnahme ein leicht erhöhtes Signal im Vergleich zur vorher ausgeschiedenen Urinprobe bei 12:40 Stunden nach Substanzeinnahme zeigt.

3.1.1.5 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch

Im Sumpter Assay wurde außerdem ein Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Als positiv wurden dabei Urinproben gewertet die ein Absorptionssignal größer 120 % der Referenzprobe zum Zeitpunkt 0 aufwiesen. Mittels des Sumpter Assays konnten somit 35 von 46 Proben als positiv detektiert werden. Eine Korrelation zwischen der Signalstärke und den Morgenurinen (21 h, 43,5 h, 69,5 h, 94 h, 118 h, 143 h, 165,5 h, 187 h, 210,5 h, 234,5 h) war nur bei den Zeitpunkten 118 h, 143 h, 187 h und 234,5 h nach Substanzeinnahme zu erkennen.

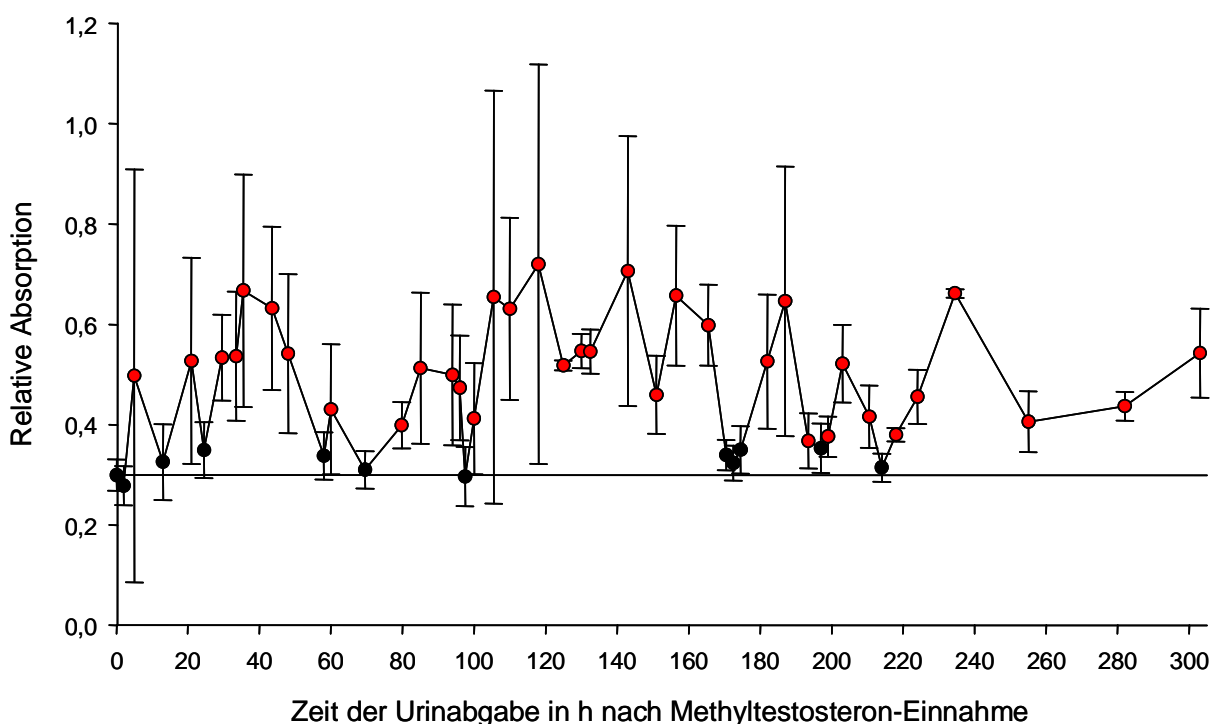


Abbildung 3.5 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im Sumpter Assay. Es wurden 20 % Urin im Hefemedium eingesetzt. Zum Zeitpunkt 0 wurden 5 mg Methyltestosteron oral eingenommen. Der Wert dieser Urinprobe wurde als Referenzprobe verwendet und ist im Diagramm durch eine Gerade markiert. Rot markierte Werte mit einer Fluoreszenz größer 0,36 (120 % des Referenzwertes) wurden als positiv gewertet.

3.1.1.6 Effekte der Urinaufarbeitung im Sumpter Hefeassay

Dieser Versuch wurde von Antje Beyer als technische Assistentin und Felicitas Rataj als studentische Hilfskraft durchgeführt. Es wurden die Etherextraktion, die Zugabe von NaN_3 (1 g/l) und die Reinigung über C18/ NH_2 Festphasenextraktions-Säulen getestet. Die Etherextraktion und die Behandlung mit Festphasenextraktions-Säulen dienen der Reinigung und Konzentrierung des Urins. Die Zugabe von NaN_3 dient der Abtötung von Bakterien und dem Konservieren von Urinproben.

Nach einer Etherextraktion wurde das Signal von Sammelurin mit DHT bei einer Probenkonzentration von 20 % im Hefemedium im Vergleich zu einer unbehandelten Urinprobe mit DHT stärker, da durch die Etherextraktion die Urininhaltsstoffe 10fach konzentriert wurden (Abbildung 3.6 A). Allerdings ist auch bereits ein Anstieg des Signals bei Sammelurin ohne Zugabe von DHT nach einer Etherextraktion zu beobachten.

Durch die Zugabe von NaN_3 zum Urin sterben die Hefen nach Zugabe von 20% Urin zum Hefemedium ab (Abbildung 3.6 B). Nach Zugabe von 2 % Urin ins Hefemedium ist dieser Effekt erst schwach ausgeprägt, allerdings ist bei dieser Urinkonzentration auch erst eine geringe Wirkung von Sammelurin versetzt mit 10^{-6} M DHT zu beobachten.

Urinproben nach Aufreinigung über Festphasenextraktions-Säulen zeigten ohne und mit Zugabe von 10^{-9} M DHT einen Anstieg des Signals ab einer Konzentration von 0,2 % Probe im Hefemedium mit einer maximalen relativen Absorption von ca. 2,5 bei einer Konzentration von 2 % Probe im Hefemedium (Abbildung 3.6 C). Bei der Reinigung des Urins über Festphasenextraktions-Säulen wurde nur ein unabhängiges Experiment durchgeführt, da nur eine begrenzte Menge Säulen zur Verfügung stand und ein eindeutiges Ergebnis erzielt wurde. Deshalb sind auch keine Standardabweichungen bei diesen Konzentrations-Wirkungskurven aufgetragen. Durch die Behandlung des Urins über Festphasenextraktions-Säulen wurden die Urininhaltsstoffe zwanzigfach konzentriert.

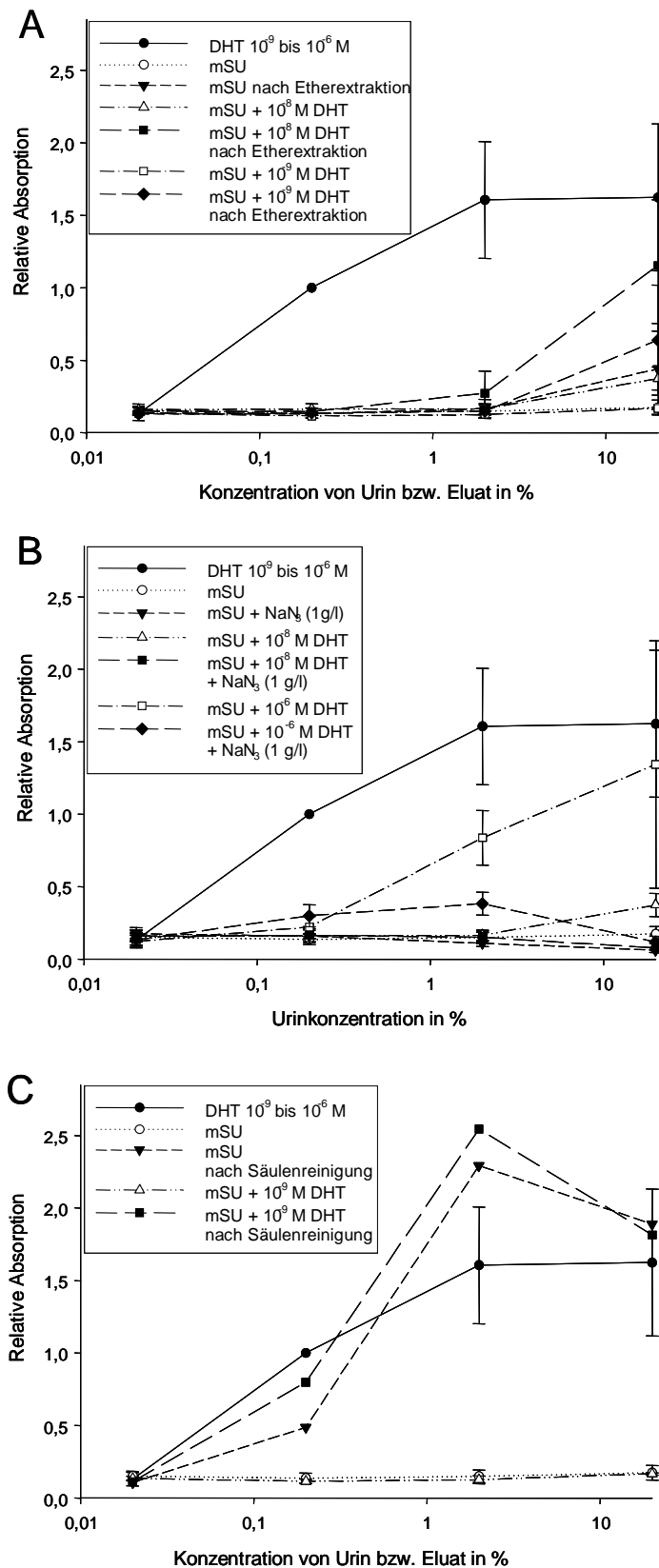


Abbildung 3.6 Konzentrations-Wirkungskurven von Sammelurin von Männern nach Urinaufarbeitung im Sumpter Hefeassay. Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungskurven von Sammelurinproben von Männern (mSU) mit und ohne Zusatz von DHT nach Etherextraktion (A), unter Zugabe von NaN_3 (B) und nach Reinigung über Festphasenextraktions-Säulen (C) im Vergleich zu DHT in Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-6} M ohne Zusatz von Urin.

3.1.1.7 Antiandrogene und Naringeninderivate im Sumpter Hefeassay

Um die Fähigkeit des Hefeassays zum Nachweis von antiandrogenen Eigenschaften von Substanzen zu testen, wurden Flutamid, Nilutamid und Bicalutamid, drei starke Antiandrogene, und die zwei Naringeninderivate 8-PN und 6-DMAN in den Test eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

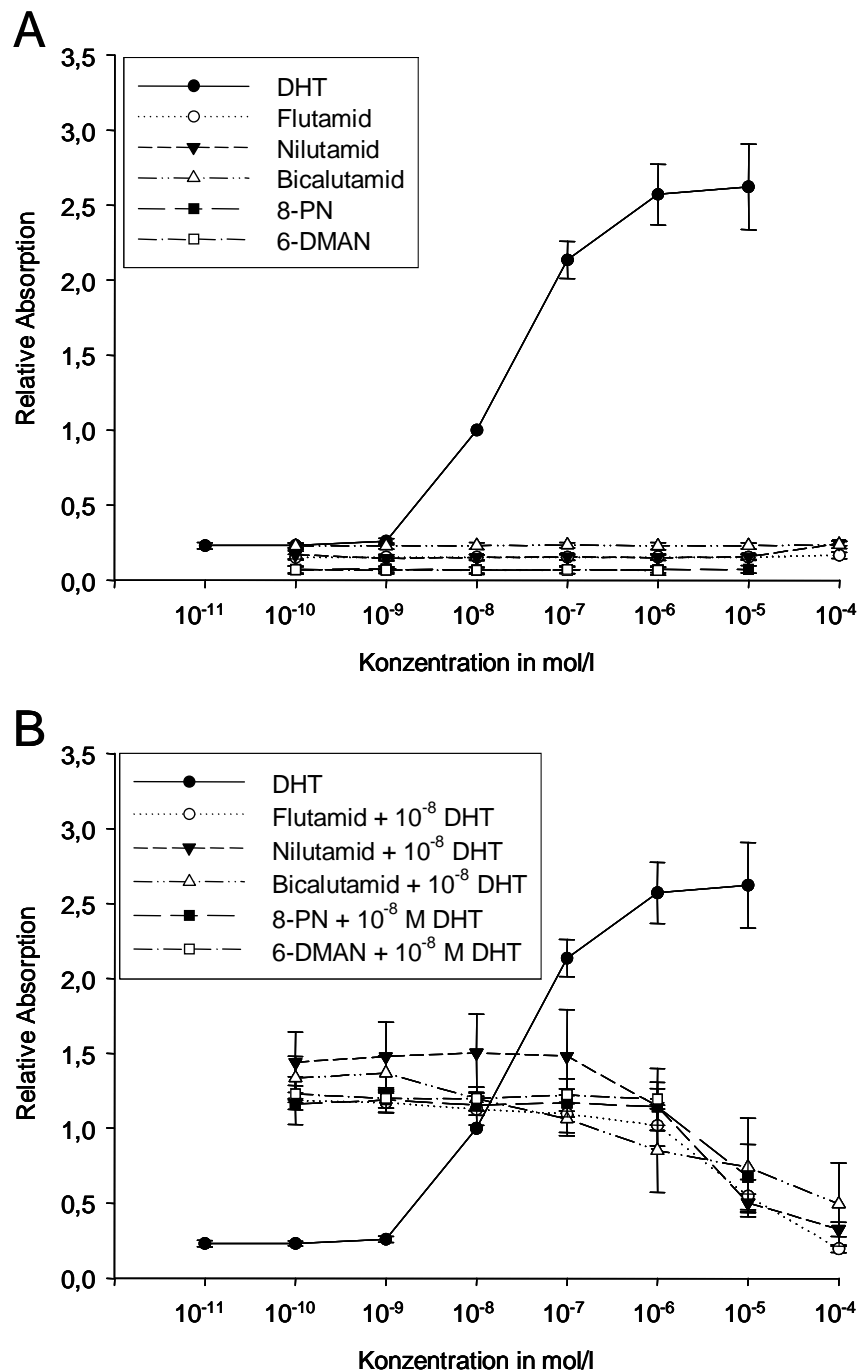


Abbildung 3.7 Konzentrations-Wirkungskurven von Antiandrogenen im Sumpter Hefeassay. Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungskurven von Flutamid, Nilutamid, Bicalutamid, 8-PN und 6-DMAN ohne (A) und mit Zusatz von 10^{-8} M DHT (B). DHT wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

Die drei Antiandrogene zeigten im Hefeassay bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M keine androgene Wirkung (Abbildung 3.7 A), waren aber in der Lage die Wirkung von 10^{-8} M DHT fast vollständig zu antagonisieren (Abbildung 3.7 B). Auch 8-PN und 6-DMAN zeigten keine Wirkung im androgenen Test (Abbildung 3.7 A). Allerdings konnte für 8-PN ein geringer antiandrogener Effekt in einer Konzentration von 10^{-5} M festgestellt werden (Abbildung 3.7 B). 8-PN zeigte sich in der Konzentration 10^{-4} M und 6-DMAN in den Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-4} M toxisch für die Hefen. Deshalb konnten in diesen Konzentrationen keine Werte aufgenommen werden.

3.1.1.8 SARMs im Sumpter Hefeassay

Da der Hefeassay Antiandrogene erkennt, wurden auch zwei SARMs getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Beide SARMs zeigten bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M keinen androgenen Effekt. Das SARM 4-F konnte die Wirkung von 10^{-8} M DHT ab einer Konzentration von 10^{-5} M schwach antagonisieren.

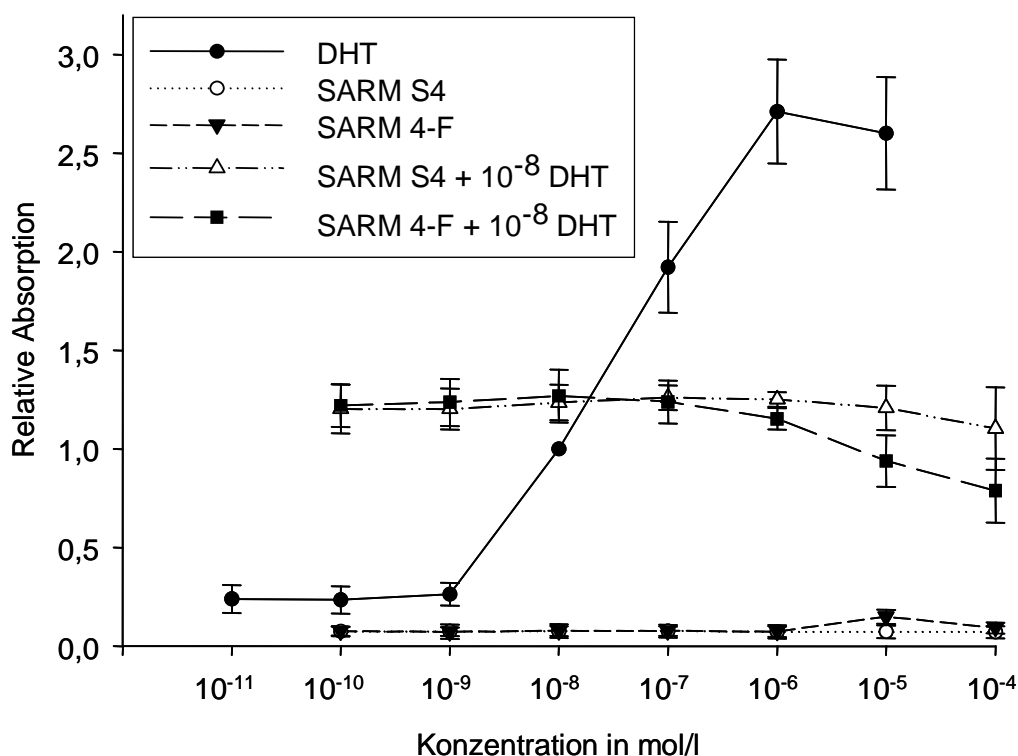


Abbildung 3.8 Konzentrations-Wirkungskurven von SARMs im Sumpter Hefeassay Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungskurven von SARM S4 und SARM 4-F ohne und mit Zusatz von 10^{-8} M DHT. DHT wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

3.1.1.9 EC50 der getesteten Substanzen im Sumpter Hefeassay

Die EC50 Werte wurden mittels SigmaPlot 9.0 bestimmt und sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Einige Konzentrations-Wirkungskurven konnten hinsichtlich des EC50 nicht ausgewertet werden, da kein annähernd sigmoidaler Kurvenverlauf erkennbar war.

Tabelle 3.1 EC50 Werte der getesteten Substanzen im Sumpter Hefeassay (n.a., nicht auswertbar). Bei Werten mit Ausrufezeichen hat die Konzentrations-Wirkungskurve kein Plateau erreicht.

Substanz	EC50 in mol/l	Standard-abweichung	Substanz	EC50 in mol/l	Standard-abweichung
DHT	$6,807 \times 10^{-9}$	$3,649 \times 10^{-9}$	Aldosteron	n. a.	n. a.
Boldenon	$1,18 \times 10^{-7}$	$3,39 \times 10^{-7}$	Dehydroepiandrosteron	n. a.	n. a.
Boldenon-M1	$2,28 \times 10^{-7}$	$5,25 \times 10^{-7}$	Dexamethason	n. a.	n. a.
Mesterolol	$1,10 \times 10^{-8}$	$1,26 \times 10^{-6}$	17 β -Östradiol	n. a.	n. a.
Mesterolol-M1	$1,47 \times 10^{-8}$	$7,71 \times 10^{-7}$	Progesteron	$3,57 \times 10^{-7}$	$3,85 \times 10^{-7}$
Metandienon	$1,46 \times 10^{-7}$	$3,61 \times 10^{-8}$	Flutamid	n. a.	n. a.
Metandienon-M2	$2,08 \times 10^{-5}$!	$1,42 \times 10^{-6}$	Nilutamid	n. a.	n. a.
Metandienon-M3	$2,08 \times 10^{-5}$!	$1,42 \times 10^{-6}$	Bicalutamid	n. a.	n. a.
Metandienon-M4	$7,60 \times 10^{-6}$!	$6,85 \times 10^{-7}$	8-PN	n. a.	n. a.
Metenolon	$1,99 \times 10^{-8}$	$3,50 \times 10^{-8}$	6-DMAN	n. a.	n. a.
Metenolon-M1	$8,77 \times 10^{-8}$	$1,02 \times 10^{-3}$	Flutamid + 10^{-8} DHT	$7,13 \times 10^{-6}$	$1,66 \times 10^{-6}$
Nandrolon	$1,42 \times 10^{-8}$	$2,00 \times 10^{-8}$	Nilutamid + 10^{-8} DHT	$2,26 \times 10^{-6}$	$3,38 \times 10^{-7}$
Nandrolon-M1	$1,20 \times 10^{-7}$	$3,26 \times 10^{-2}$	Bicalutamid + 10^{-8} DHT	$3,48 \times 10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-5}$
Nandrolon-M2	n. a.	n. a.	8-PN + 10^{-8} M DHT	n. a.	n. a.
Oxandrolon	$8,85 \times 10^{-8}$	$1,16 \times 10^{-8}$	6-DMAN + 10^{-8} M DHT	n. a.	n. a.
Oxandrolon-M1	n. a.	n. a.	SARM S4	n. a.	n. a.
Stanozolol	$7,36 \times 10^{-7}$	$2,13 \times 10^{-9}$	SARM 4-F	n. a.	n. a.
Stanozolol-M1	$6,35 \times 10^{-7}$	$4,43 \times 10^{-9}$	SARM S4 + 10^{-8} M DHT	n. a.	n. a.
Stanozolol-M3	$8,16 \times 10^{-7}$	$2,34 \times 10^{-9}$	SARM 4-F + 10^{-8} M DHT	n. a.	n. a.
Stanozolol-M4	n. a.	n. a.			

3.1.2 Charakterisierung des Sumpter Plasmids

Um den Sumpter Stamm genetisch verändern zu können wurde zunächst das Sumpter Plasmid charakterisiert. Das Plasmid wurde aus den Sumpter Hefen (PGKhAR- Stamm) isoliert und in *E. coli* transformiert. Die transformierten *E. coli* wurden auf LB Platten mit verschiedenen Antibiotika (Ampicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Kanamycin, Spectinomycin, Streptomycin) ausplattiert. Nur auf der LB Platte mit Ampicillin sind Kolonien gewachsen. Das Sumpter Plasmid hat demzufolge eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker in *E. coli*. Aus positiven *E. coli* Klonen wurde das Sumpter Plasmid mittels Plasmid-Mini-Isolierung aufgereinigt. Zur Charakterisierung wurde das Sumpter Plasmid mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Die charakteristischen Banden sind in Abbildung 3.9 zu sehen.

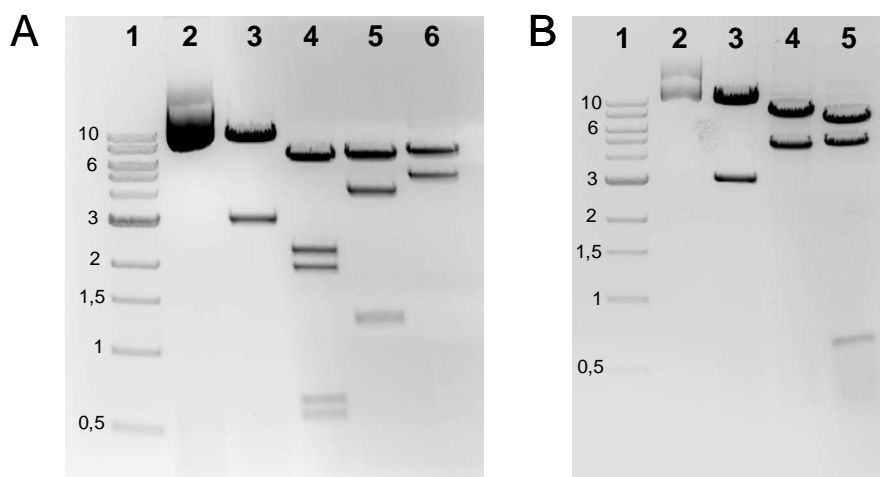


Abbildung 3.9 Gelelektrophoresegele der Restriktionsanalyse des Sumpter-Plasmids. In Spur 1 wurde der 1kb Marker von NEB aufgetragen. Die Banden sind mit ihrer entsprechenden Größe in kb markiert. In Abbildung A wurde in Spur 2 unverdautes Sumpter-Plasmid, in Spur 3 *Bam*HI verdautes, in Spur 4 *Dra*I verdautes, in Spur 5 *Nde*I verdautes und in Spur 6 *Sma*I verdautes Plasmid aufgetragen. In Abbildung B wurde in Spur 2 unverdautes Sumpter-Plasmid, in Spur 3 *Bam*HI verdautes, in Spur 4 *Bgl*III verdautes und in Spur 5 *Nhe*I verdautes Plasmid aufgetragen.

Anhand der Restriktionen kann das Sumpter Plasmid auf ein Molekulargewicht von etwa 13 kb geschätzt werden. Es weist zwei *Bam*HI, zwei *Bgl*III, drei *Nhe*I, fünf *Dra*I, drei *Nde*I und zwei *Sma*I Schnittstellen auf. Zur weiteren Charakterisierung des Plasmids wurde ausgehend vom Hefe PGK1 Promoter (GenBank accession number: FJ415226; Abbildung 3.10) mit den Sequenzierprimern yPGKfor, yPGKrev1 und yPGKrev2 sequenziert.

```
GGAATTCAGATCTTGAATTGATGTTACCCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGA
TTTGTGTTGCAAAAAGAACAAAACCTGAAAAACCCAGACACGCTCGACTTCCTGTCTTCCTATTGATTGCAGCTTCCAAT
TTCGTCACACAACAAGGTCCTAGCGACGGCTCACAGGTTTTGTAAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGAATGGCGGGAAGG
GTTTAGTACCACATGCTATGATGCCCACTGTGATCTCCAGAGCAAAGTTCGTTTCGATCGTACTGTTACTCTCTCTCTTT
CAAACAGAATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTTCTTCTAACCAAGGGGGTGGTTTA
GTTTAGTAGAACCTCGTGAACTTACATTTACATATATATAAACTTGCATAAATTTGGTCAATGCAAGAAATACATATTT
GGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCTTAGATGCTTTCTTTTCTTTTCTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATT
ATCTACTTTTACAACAAATATAAAACAATGCGCAGCAGGTAAGCTTGGG
```

Kursiv: Lage der Primer

Grün: Bindungsregion für Transkriptionsaktivatoren

Abbildung 3.10 Nukleobasensequenz des Hefe *PGK1* Promoters.

Mit dem Primer yPGKrev1 konnte keine Sequenzierung erreicht werden, da die Bindungsstelle des Primers nicht im Sumpter Plasmid enthalten war. Weitere Sequenzierungen wurden mit den Primern LacZfor1, yPGKfor2, yPlrev2 und LacZfor durchgeführt. Die Sequenzierungen haben gezeigt, dass das Sumpter Plasmid den

PGK-Promoter mit drei androgen responsiven Elementen in der Bindungsregion für Transkriptionsaktivatoren gefolgt vom *lacZ* Gen enthält (Abbildung 3.11). Außerdem konnte das Gen für die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Permease (*AUS1*, Gene ID: 854175) aus *S. cerevisiae* auf dem Sumpter Plasmid mittels des Programms BLASTN 2.2.25 (Zhang et al., 2000) identifiziert werden. Diese Permease gehört zur Familie der ABC Transporter und ist bei der Aufnahme von Sterol in die Zelle beteiligt (Sullivan et al., 2009).

```

AACGAGTGTTCCTCCTTCTTGAATTGATGTTACCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTC
GCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAAAACTGAAAAACCCCGGATCGGTACAAATGTTCTAGGTACAAATGTTCT
CGGTACAAATGTTCTGAGCTCAAAGCGGCCCGGATCCGGTCGTACACAACAAGGTCCTAGCGACGGCTCACAGGTTT
TGTAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGAATGGCGGGAAGGGTTTAGTACCACATGCTATGATGCCCACTGTGATCTCCAG
AGCAAAGTTCGTTCGATCGTACTGTTACTCTCTCTCTTTCAAACAGAATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGT
TCTCACACACTCTTTTCTTCTAACCAGGGGGTGGTTTAGTTTAGTAGAACCTCGTGAAACTTACATTTACATATATAT
AACTTGCAATAATGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCCTTAGATGCT
TTCTTTTTCTCTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTTACAACAAATACAAAGATCTGCTAGCAAA
AATGTCTCACGCGTCTCCCGGGGATCCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAAT
CGCCTTGACAGCATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG

```

Blau: PGK Promoter

Grün: ARE (androgen respons element)

Rot: *lacZ*

Fett: Restriktionsschnittstellen (*PmlI*, *BglII*, *NheI*, *BamHI*)

Unterstrichen: Startcodon

Abbildung 3.11 Nukleobasensequenz des PGK-Promoters im Sumpter Plasmid

Um den Hefeselektionsmarker auf dem Sumpter Plasmid zu identifizieren, wurde das Plasmid in den Hefestamm BY4741a transformiert. Dieser Hefestamm ist auxotroph für Histidin, Methionin, Uracil und Leucin. Die Transformanden wurden auf w_0 Mediumplatten, in der jeweils eine der vier Aminosäuren nicht enthalten war, sowie auf einer Platte mit allen Aminosäuren (Positivkontrolle) ausgespatelt. Nur auf der Platte mit der Positivkontrolle und der Platte ohne Uracil sind Transformanden gewachsen. Auf dem Sumpter Plasmid ist demzufolge ein Uracil-Selektionsmarker vorhanden.

Das Sumpter Plasmid ist mit etwa 13 kb ein relativ großes Plasmid. Als Ausgangsplasmid für die Klonierung ist das Sumpter Plasmid aufgrund seiner Größe, seiner unbekannten Sequenz und vor allem aber wegen fehlender geeigneter Restriktionsschnittstellen ungeeignet. Für den Austausch des Reportergens wurden deshalb zusätzlich die Plasmide p416ADH als „low copy“ Plasmid und das Plasmid p426ADH als „high copy“ Plasmid in *S. cerevisiae* verwendet.

3.1.3 Klonierung des PGK-Promoters, *EGFP* und *lacZ* in den Sumpter Hefen

3.1.3.1 Amplifikation und Restriktion des PGK-Promoters, *EGFP* und *lacZ*

Der PGK-Promoter mit den androgen responsiven Elementen wurde mit den Primern yPGKforDraI_2 und yPGKrevSpeI_2 und dem Plasmid pSumpter als Template amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt enthielt 5'-seitig eine *DraI* und 3'-seitig eine *SpeI* Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde nacheinander mit *DraI* und *SpeI* verdaut.

Die Amplifikation des *EGFP*-Gens wurde mit den Primern EGFPforSpeI und EGFPprevBamHI und dem Plasmid p416ADH-EGFP als Template realisiert. Das *EGFP*-Amplifikat hatte 5'-seitig eine *SpeI* und 3'-seitig eine *BamHI* Schnittstelle für die Klonierung in die Plasmide p416PGK und p426PGK. Außerdem wurde noch ein *EGFP*-Amplifikat mit dem Primerpaar EGFPforBamHI / EGFPprevBamHI synthetisiert. Dieses Produkt besaß an beiden Seiten *BamHI* Schnittstellen und diente der Klonierung in das Sumpter Plasmid. Die PCR-Produkte wurden entsprechend ihrer Restriktionsschnittstellen verdaut.

Das *lacZ* Gen wurde mit den Primern LacZforSpeI_3 und LacZrevBamHI_2 und dem Plasmid pSumpter als Template amplifiziert. Das Amplifikat besaß 5'-seitig eine *SpeI* und 3'-seitig eine *BamHI* Schnittstelle und wurde mit *SpeI* und *BamHI* verdaut.

3.1.3.2 Klonierung in p416ADH und p426ADH

Um den ADH-Promoter aus den Plasmiden p416ADH und p426ADH zu isolieren, sollten die Plasmide zuerst mit *SacI* verdaut werden. Allerdings schneidet das Restriktionsenzym *SacI* auch im PGK-Promoter. Deshalb wurden die 3'-überhängenden Enden der *SacI* Schnittstelle in den Plasmiden abgebaut. Dadurch entstand ein stumpfes Ende, welches mit dem PGK PCR-Produkt, das wiederum mit *DraI* (stumpfe Enden generierendes Enzym) verdaut wurde, ligiert werden kann. Anschließend wurden die Plasmide mit *SpeI* verdaut wobei der ADH Promoter herausgeschnitten wurde. Um eine Religation des Promoterfragments mit dem Vektor zu verhindern, wurde das geschnittene Plasmid mittels Agarosegelelektrophorese von dem Fragment, welches den ADH-Promoter enthält, getrennt und aus dem Gel extrahiert. Eine mögliche Religation des Vektors ohne Insert während der Ligation wurde durch Dephosphorylierung des Vektors verhindert. Das geschnittene PGK PCR-Produkt wurde mit den geschnittenen Vektoren ligiert und in *E. coli* DH10B transformiert. Positive Klone wurden mittels Plasmid Mini Präparation und Proberestriktion mit *SacI* und *BamHI* identifiziert. Je ein positiver Klon wurde zur Kontrolle mit dem Sequenzierprimer

pRS416rev1 ansequenziert. Beide Klone enthielten das korrekte Konstrukt und die so konstruierten Plasmide wurden p416PGK und p426PGK genannt. Mit je einer Plasmid-Mini-Präparation von p426PGK und p416PGK aus verifizierten positiven Klonen wurde weitergearbeitet. Die Plasmide wurden nacheinander mit *SpeI* und *BamHI* in der multiplen Klonierungsstelle verdaut. Die Ligation erfolgte mit geschnittenem und dephosphoryliertem Vektor und den geschnittenen PCR-Produkten von *EGFP* bzw. *lacZ*. Es wurden beide Gene kloniert um die Ergebnisse mit dem ursprünglichen Sumpter Plasmid vergleichen zu können. Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* DH10B transformiert. Positive Klone wurden mittels *BamHI* und *SpeI* Endonukleaseverdau der isolierten Plasmide identifiziert. Die *EGFP* Plasmide wurden zur Kontrolle mit den Sequenzierprimern yEGFPfor1, pl416PGKEGFP1 und pl416PGKEGFP2 ansequenziert, die *lacZ*-Plasmide mit dem Sequenzierprimer PGKfor. Die konstruierten Plasmide wurden p416PGKlacZ, p426PGKlacZ, p416PGKEGFP und p426PGKEGFP genannt. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang in den Abbildungen 7.1 bis 7.4 dargestellt.

3.1.3.3 Klonierung in das Sumpter Plasmid

Aus dem Sumpter Plasmid wurde mit *BamHI* das *lacZ* Gen herausgeschnitten. Die Lage der Schnittstellen ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

```

TTTTCTCTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTACAACAAATACAAAAGATCTGCTAGCAA
AATGTCACGCGTCTCCCGGGGATCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAAC
TAATCGCCTTGAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG . . .
. . . GTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCAGGGGGATCCGATCTTCCGGGAAATAAATTG

```

Blau: PGK Promoter
 Rot: *lacZ*
 Fett: *BamHI* Restriktionsendonuklease-Schnittstelle
 Unterstrichen: Start- bzw. Stoppcodon

Abbildung 3.12 Lage der *BamHI* Restriktionsschnittstellen im Sumpter Plasmid

Das mit *BamHI* verdaute *EGFP*-Gen wurde in den geschnittenen Vektor ligiert und die Ligation in *E. coli* DH10B transformiert. Positive Klone wurden mittels *BamHI*-Verdau identifiziert. Um die Ausrichtung des *EGFP*-Gens im Sumpter Plasmid festzustellen, wurde das konstruierte Plasmid mit dem Sequenzierprimer yPGKfor ansequenziert. Das sequenzierte Plasmid enthielt das *EGFP*-Gen in richtiger Orientierung. Das Plasmid wurde pSumpterEGFP genannt.

3.1.4 Generierung plasmidfreier Sumpter Hefen

Wie bereits beschrieben, konnte auf dem Sumpter Plasmid ein *URA*-Selektionsmarker identifiziert werden. Ohne entsprechenden Selektionsdruck kann ein Plasmidverlust in Hefen beschleunigt werden. Um plasmidfreie Sumpter-Hefen zu generieren, wurden diese deshalb vier Tage in Vollmedium (YPD) mit täglichem neuen Animpfen kultiviert, auf einer YPD Platte vereinzelt und davon 50 Einzelkolonien auf eine YPD-Platte ausgestrichen. Da die Auxotrophien (außer Uracil) des Sumpter Stammes nicht bekannt waren, wurden die Kolonien auf eine w_0 Platte ohne Zusätze, eine w_0 Platte mit Uracil, eine w_0 Platte mit Adenin, Histidin, Leucin und Uracil (Positivkontrolle) und eine w_0 Platte mit Adenin, Histidin, Leucin, Methionin und Tryptophan, aber ohne Uracil überstempelt. Auf der w_0 Platte und der w_0 Platte mit Uracil sind keine Kolonien gewachsen. Auf der w_0 Platte mit Adenin, Histidin, Leucin und Uracil sind alle Kolonien gewachsen. Auf der w_0 Platte mit Adenin, Histidin, Leucin, Methionin und Tryptophan sind vier Kolonien nicht gewachsen, welche offensichtlich das Sumpter Plasmid mit dem Uracil-Selektionsmarker verloren haben. Der Sumpter Stamm muss außerdem noch für mindestens einen der Zusätze Adenin, Histidin und Leucin auxotroph sein, denn auf einer w_0 Platte nur mit Uracil konnte er nicht wachsen. Durch den gezielten Verzicht auf ein oder zwei der Supplemente wurde festgestellt, dass der Sumpter Stamm zusätzlich zu Uracil auch für Leucin auxotroph ist.

3.1.5 Generierung und Charakterisierung der genetisch veränderten Sumpter Hefen

Eine der generierten plasmidfreien Hefen wurde für die Transformation verwendet. In die Hefe wurden die *lacZ*-Plasmide p416PGKlacZ und p426PGKlacZ, die EGFP Plasmide p416PGKEGFP, p426PGKEGFP und pSumpterEGFP bzw. als Positivkontrolle das ursprüngliche Sumpter Plasmid pSumpter transformiert. Positive Klone wurden auf w_0 ade, leu, his Platten selektiert. Je ein positiver Klon wurde im Sumpter Medium angezogen und im androgenen Hefeassay getestet. Die Fluoreszenz (Excitation 485nm; Emission 535nm) der Stämme mit den EGFP-Plasmiden und die Absorption (560 nm) der Sumpter Stämme mit den *lacZ*-Plasmiden wurden über einen Zeitraum von 68 bzw. 60 Stunden unter DHT-Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-5} M gemessen. Als Referenz wurde jeweils die Absorption bei 690 nm bestimmt.

Die Graphen des original Sumpter Stammes sind als Positivkontrolle in Abbildung 3.13 dargestellt. Die Signalmaxima liegen bei ca. 48 Stunden. Die Konzentrations-Wirkungskurve nach 48 Stunden Inkubation zeigt einen guten Anstieg bis zu einer DHT-Konzentration von 10^{-6} M. Bei einer DHT-Konzentration von 10^{-5} M sinkt die Absorption wieder geringfügig.

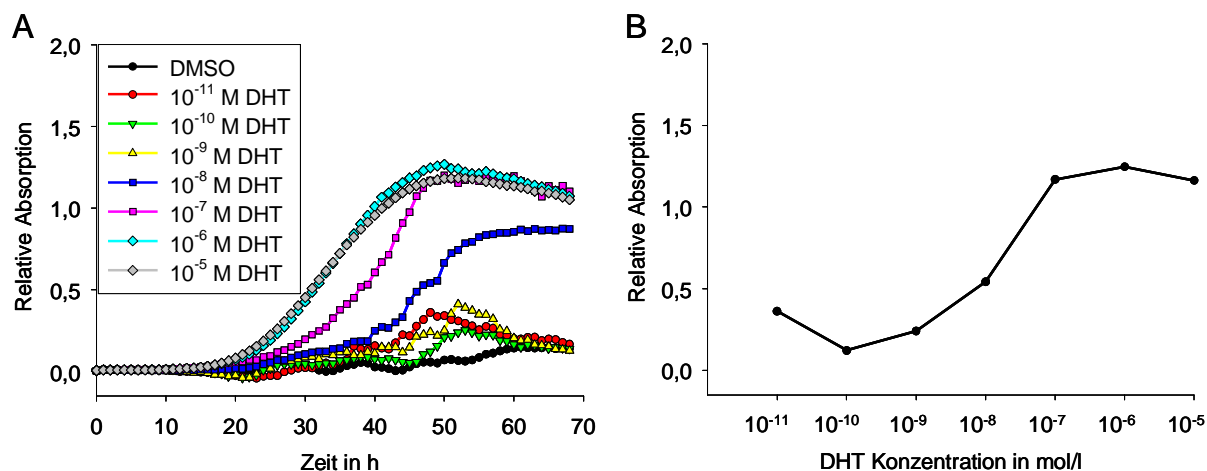


Abbildung 3.13 Absorptionsmessung des original Sumpter Stammes über 68 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M und DMSO als Negativkontrolle (A). B zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 48 Stunden Inkubation.

Der plasmidfreie Sumpter Stamm wurde als zweite Positivkontrolle mit dem original Sumpter Plasmid pSumpter transformiert und in dem Experiment mitgeführt. Dieser Stamm zeigt über 68 Stunden, als auch bei 48 Stunden ähnliche Konzentrations-Wirkungskurven (Abbildung 3.14) wie der original Sumpter Stamm. Das Signal ist sogar etwas stärker als beim original Sumpter Stamm.

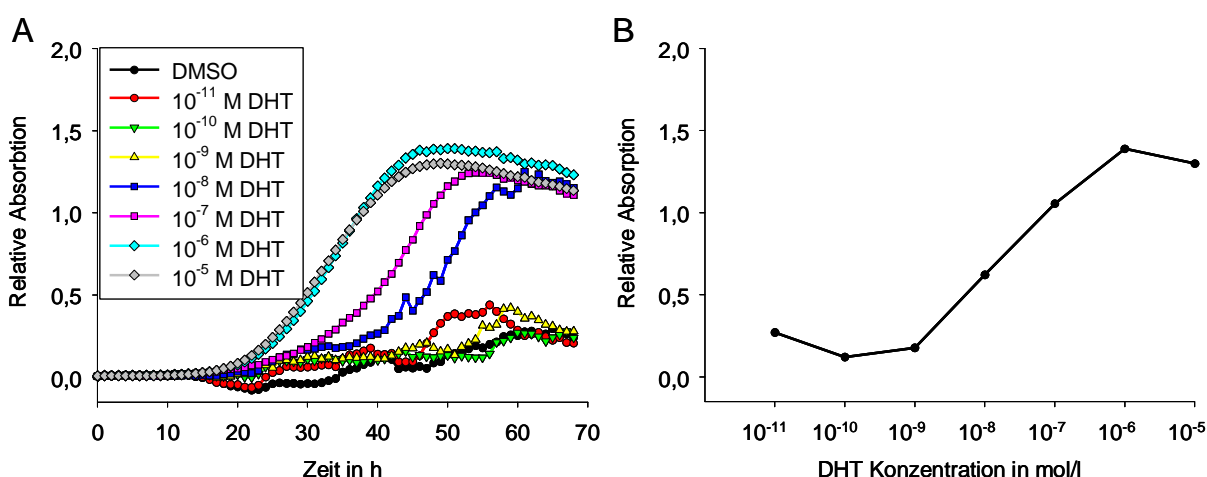


Abbildung 3.14 Absorptionsmessung des Sumpter Stammes transformiert mit dem original Sumpter Plasmid über 68 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M und DMSO als Negativkontrolle (A). B zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 48 Stunden Inkubation.

Der mit dem *low-copy* Plasmid p416PGKlacZ transformierte plasmidfreie Sumpter Stamm zeigt kein spezifisches Signal bei steigender DHT-Konzentration (Abbildung 3.15). Es wurden auch noch 10 andere Klone getestet, die aber auch keinen Farbumschlag unter DHT Induktion zeigten.

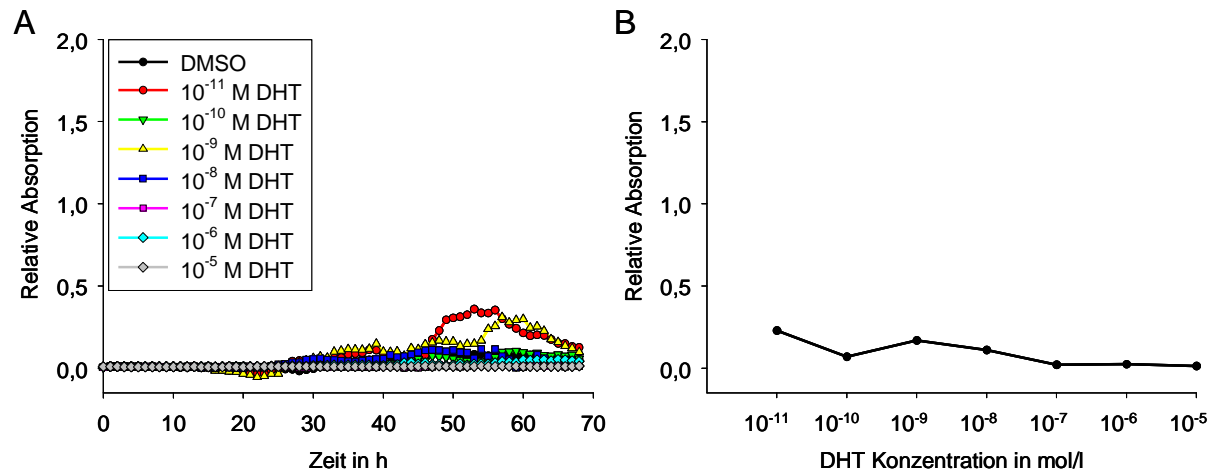


Abbildung 3.15 Absorptionsmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p416PGKlacZ über 68 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M und DMSO als Negativkontrolle (A). B zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 48 Stunden Inkubation.

Der mit dem „*high copy*“ Plasmid p426PGKlacZ transformierte Sumpter Stamm zeigt erst bei 58 Stunden ein Signalmaximum (Abbildung 3.16). Bei der Messung nach 48 Stunden ist zu erkennen, dass das Hintergrundsignal relativ hoch ist, denn schon eine DHT Konzentration von 10^{-10} M zeigt eine Absorption von 0,4. Außerdem wird eine geringere Maximalstärke (ca. 1) im Vergleich zum original Sumpter Stamm (Signalmaximum ca. 1,3) erreicht.

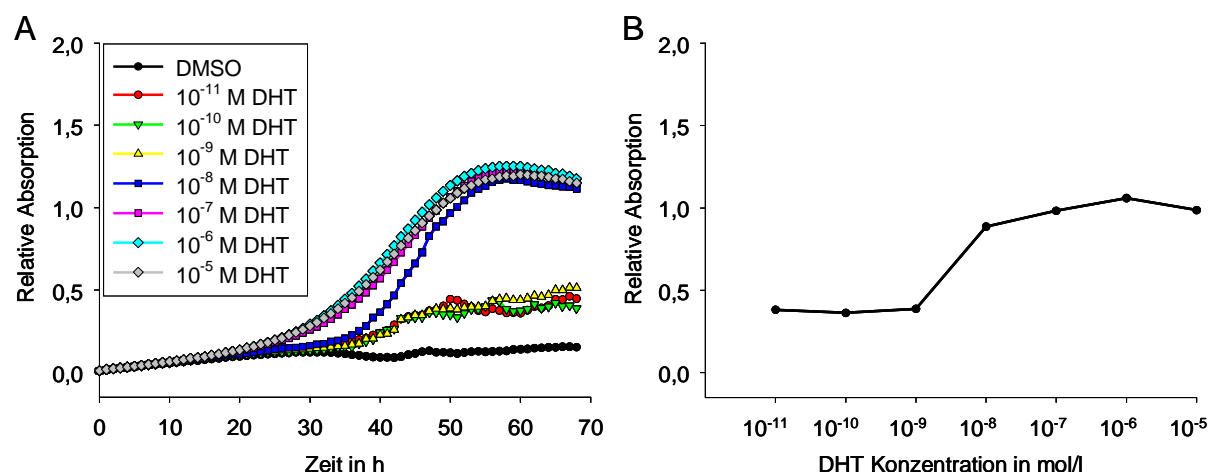


Abbildung 3.16 Absorptionsmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p426PGKlacZ über 68 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M und DMSO als Negativkontrolle (A). B zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 48 Stunden Inkubation.

Der Sumpter Stamm mit dem Plasmid pSumpterEGFP zeigte nach 24 Stunden ein Signalmaximum, das bei ca. 1500 Fluoreszenzeinheiten lag (Abbildung 3.17). Die Konzentrations-Wirkungskurve nach 24 Stunden zeigt einen starken Signalanstieg von 10^{-9} M zu 10^{-8} M DHT. Bei höheren DHT Konzentrationen sinkt das Signal wieder.

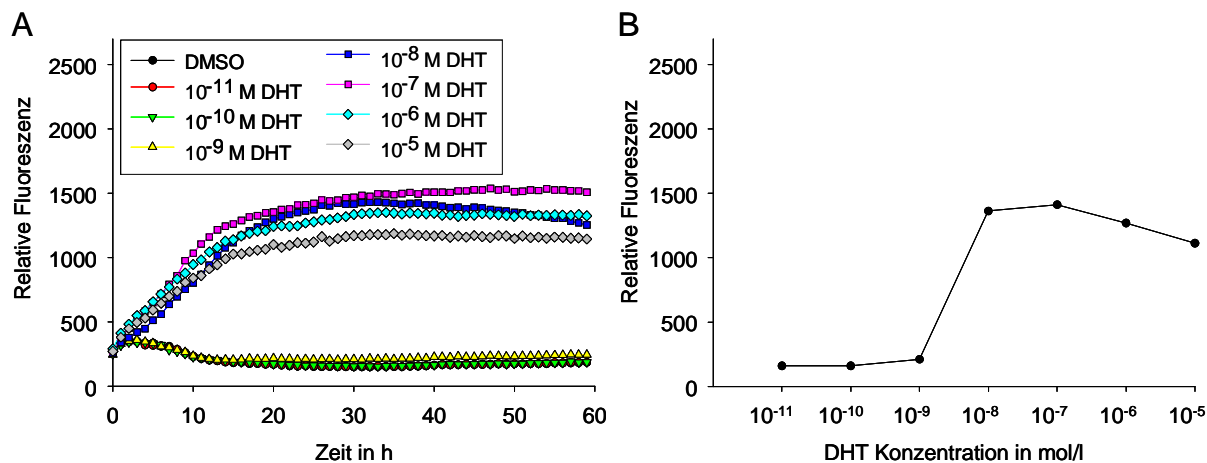


Abbildung 3.17 Fluoreszenzmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid pSumpterEGFP über 60 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M und DMSO als Negativkontrolle (A). B zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 24 Stunden Inkubation.

Auch der Sumpter Stamm mit dem Plasmid p416PGKEGFP zeigte nach 24 Stunden ein Signalmaximum, allerdings bei ca. 2800 Fluoreszenzeinheiten (Abbildung 3.18). Die Konzentrations-Wirkungskurve nach 24 Stunden Inkubation sieht der des Sumpter Stammes mit dem Plasmid pSumpterEGFP zum gleichen Zeitpunkt sehr ähnlich.

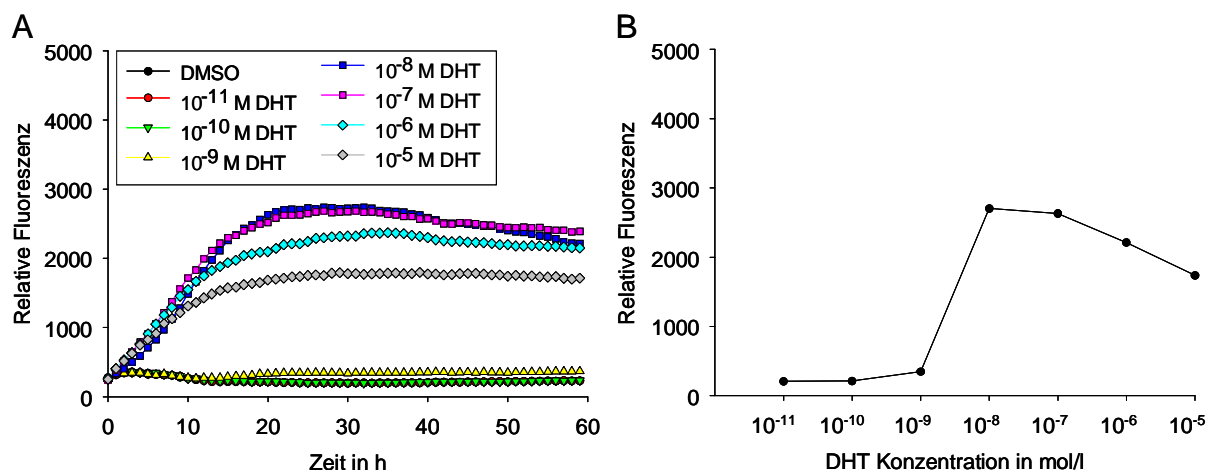


Abbildung 3.18 Fluoreszenzmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p416PGKEGFP über 60 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M und DMSO als Negativkontrolle (A). B zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 24 Stunden Inkubation.

Bei der Hefe mit dem Plasmid p426PGKEGFP konnte eine starke relative Fluoreszenz bei einer DHT-Konzentration von 10^{-7} M festgestellt werden (Abbildung 3.19). Das Signalmaximum wird hier mit hoher Signalstärke (15000 Fluoreszenzeinheiten) nach 24 Stunden erreicht (A). Die nach 24 Stunden aufgenommene Konzentrations-Wirkungskurve zeigt einen Anstieg bis 10^{-7} M DHT. Bei höheren DHT Konzentrationen sinkt die Signalstärke wieder ab.

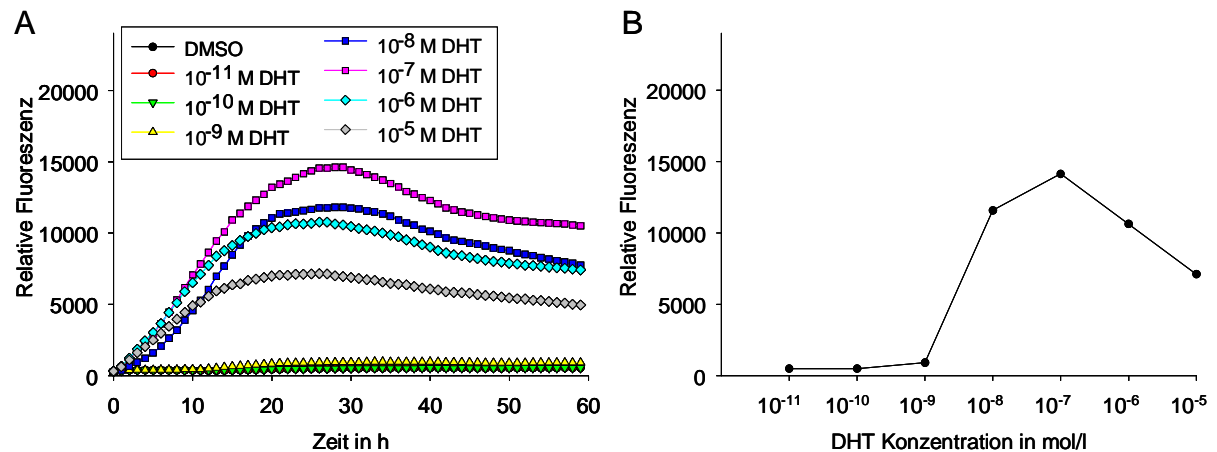


Abbildung 3.19 Fluoreszenzmessung des Sumpter Stammes mit dem Plasmid p426PGKEGFP über 60 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M und DMSO als Negativkontrolle (A). B zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve nach 24 Stunden Inkubation.

3.2 Konstruktion eines *S. cerevisiae* Assays im Hefestamm BY4741

3.2.1 Klonierung

Das Androgenrezeptor-Gen (*ARI*) ist im Sumpter Stamm in das Genom integriert, weshalb dieser Stamm für die vorherigen Versuche verwendet wurde. Um unabhängig vom Sumpter Stamm einen *S. cerevisiae* Assay zu etablieren, ist es notwendig ein Plasmid zu konstruieren, welches das Gen für den humanen Androgenrezeptor (AR) enthält, damit dieser in *S. cerevisiae* exprimiert werden kann. Die Klonierung des AR wurde von Frau Rataj im Zuge ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

Das *ARI* Gen wurde mit den Primern hAR1BcuI(SpeI)_for und hAR1SalI_rev und dem Vektor pSGhAR als Template amplifiziert. Dadurch wurden dem PCR-Produkt am 5'-Ende die *SpeI*-Schnittstelle und am 3'-Ende die Sequenz der *SalI*-Schnittstelle hinzugefügt. Das PCR-Produkt und der Vektor p423GPD wurden mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SalI* geschnitten, ligiert und das Ligationsprodukt in *E. coli* DH10B transformiert. Einige Transformanten wurden mittels *KpnI*-Verdau und PCR mit den Primern GPDpromseqfor und

cyc1termseqrev kontrolliert. Aus einem positiven Klon wurde die Plasmid-DNA durch eine Plasmid-Midipräparation für weitere Experimente gewonnen. Um den konstruierten Klon zu verifizieren, wurde die Plasmid-DNA mit den Sequenzierprimern GPDpromseqfor, ARrev, ARrev2, ARrev3, ARfor, ARrev4, ARrev5 und GPDfor sequenziert. Bei der Sequenzierung wurde festgestellt, dass eine Mutation an Position 267 zu einem Austausch einer Aminosäure führt. Diese Mutation ist jedoch schon im Template pSGhAR zu finden. Außerdem fehlt ein Bereich von 36 Nukleobasen von Position 1369 bis 1404, welche für 12 Glycine codieren. Diese Wiederholungen von Glycinresten liegen jedoch in einem variablen Bereich und sind von Mensch zu Mensch unterschiedlich. Ein verkürzter Bereich reduziert allerdings die Expression des *ARI* Gens (Ding et al., 2005). Das Plasmid wurde p423GPDAR1 genannt. Die Plasmidkarte ist im Anhang in Abbildung 7.5 gezeigt.

Die Plasmide p423GPDAR1 und p426PGKEGFP wurden in den *S. cerevisiae* Wildtypstamm BY4741 transformiert. Um die Funktionalität des Plasmids p423GPDAR1 zu überprüfen und die Expression des Androgenrezeptors nachzuweisen, wurden Proteinproben mittels SDS-Page aufgetrennt und durch Western Blot Techniken analysiert. Der Androgenrezeptor mit einem Molekulargewicht von 110 kDa konnte durch immunologische Detektion im Zelllysats nachgewiesen werden (Abbildung 3.20).

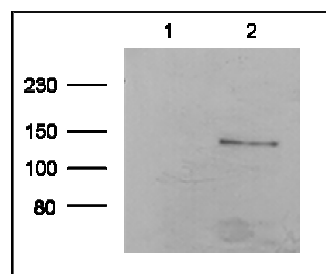


Abbildung 3.20 Immunologischer Nachweis des Androgenrezeptors im konstruierten *S. cerevisiae* Assay. Proteine wurden mittels Y-PER-Reagenz isoliert und gleiche Mengen Negativkontrolle (Stamm BY4741 ohne Plasmid) in Spur 1 und Proteinprobe des Stammes BY4741 mit den Plasmiden p423GPDAR1 und p426PGKEGFP in Spur 2 aufgetragen. Der Androgenrezeptor (110 kDa) konnte nachgewiesen werden.

3.2.2 Bestimmung der Kultivierungsbedingungen

Zur Optimierung des konstruierten *S. cerevisiae* Assays wurden verschiedene Zellzahlen pro well einer 96-well Platte getestet. Es wurden 10^4 Zellen, 5×10^4 Zellen und 10^5 Zellen in je 100 μ l Medium pro well mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} M bis 10^{-5} M über 2 Tage inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Beim Einsatz von 10^4 Zellen pro well wurde das Signalmaximum nach 22 Stunden erreicht, beim Einsatz von 5×10^4 Zellen pro well lag das Signalmaximum bei 16 Stunden und beim Einsatz von 10^5 Zellen pro well sogar bei 14 Stunden. Die maximale Signalstärke war beim Einsatz von 5×10^4 Zellen pro well mit ca. 6200 relativen Fluoreszenzeinheiten am höchsten. Deshalb wurde diese Zellzahl für alle weiteren Versuche verwendet.

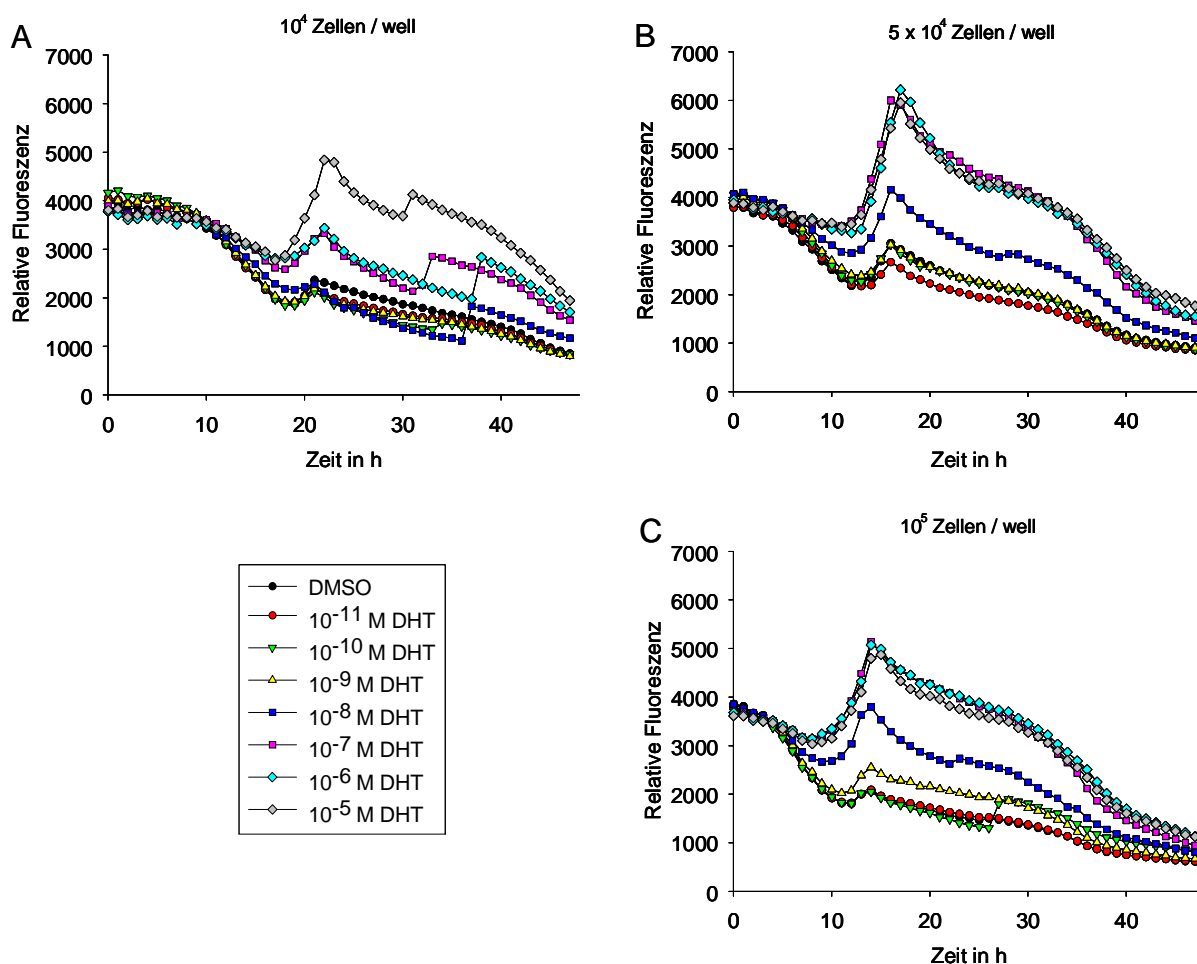


Abbildung 3.21 Test verschiedener DHT-Konzentrationen und Zellzahlen im konstruierten *S. cerevisiae* Assay. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 transformiert mit p423GPDAR1 und p426PGKEGFP wurde bei 30°C über 48 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-5} M inkubiert. Die Zellen wurden in drei verschiedenen Zellzahlen (A-C) in den Test eingesetzt.

Von der Zellzahl 5×10^4 Zellen pro *well* wurden außerdem in Abbildung 3.22 die Rohdaten, d.h. die absolute Fluoreszenz und die Trübung (OD_{690}) als Funktion der Zeit aufgetragen.

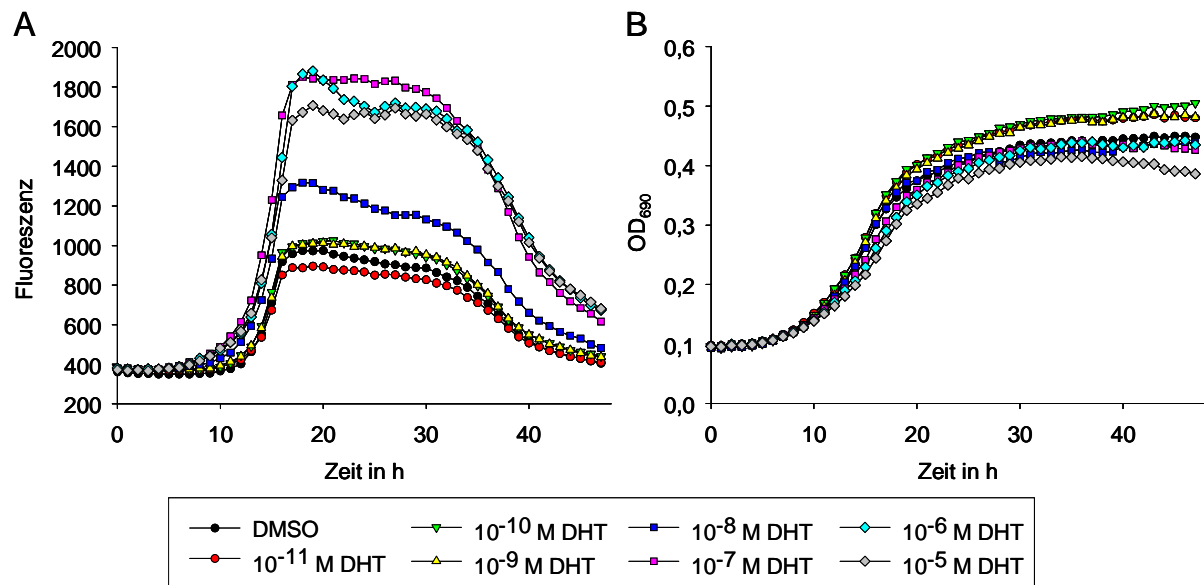


Abbildung 3.22 Fluoreszenz und Trübung des konstruierten *S. cerevisiae* Assays. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 transformiert mit p423GPDAR1 und p426PGKEGFP wurde bei 30°C über 48 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-5} M und einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen pro *well* inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenz (A) und die Trübung (B) als Funktionen der Zeit.

Es ist zu sehen, dass das Fluoreszenzsignal nach Erreichen des Maximums über ca. 10 Stunden stabil bleibt und dann stark abfällt. Die Trübung der Zellsuspension, welche die Zelldichte anzeigt, steigt bis zum Zeitpunkt des relativen Signalmaximums von 16 Stunden exponentiell an um dann in eine Plateauphase überzugehen. Dabei wird das Plateau aber nicht vollständig erreicht, sondern die Zellzahl steigt bis zum Ende des Messzeitraumes von 48 Stunden stetig an. Da die Fluoreszenz ein Plateau erreicht, die Trübung hingegen nicht, sinkt das relative Signal aus dem Quotienten der Fluoreszenz und der Trübung nach Erreichen des Signalmaximums stetig ab.

3.3 Konstruktion eines *S. pombe* Assays

3.3.1 Klonierung

Um das Transaktivierungssystem in *S. pombe* zu etablieren, wurden die Plasmide pJR1-3XU und pJR1-3XL (Moreno et al., 2000) gewählt. Diese Vektoren sind speziell für *S. pombe* konzipierte Plasmide und besitzen einen starken Promoter. In das Plasmid pJR1-3XL wurde das Gen für den humanen Androgenrezeptor Isoform 1 (*ARI*) mit den Enzymen *Xho*I und *Bam*HI kloniert. Die PCR des Androgenrezeptorgens gestaltete sich dabei kompliziert, da das Gen zahlreiche GC Wiederholungen besitzt. Durch Zusatz von 8 % DMSO in den PCR-Ansatz konnte eine Amplifikation von *hARI* mit den Primern *hAR1XhoI_for* und *hAR1BamHI_rev* und dem Template pSGhAR erreicht werden. Das entstandene Plasmid wurde mittels Sequenzierung mit den Primern ARrev, ARrev2, ARrev3, ARrev4, ARfor, ARfor2 und nmt1for2 verifiziert und pJR1-3XLAR1 genannt (Plasmidkarte im Anhang Abbildung 7.6). Das *ARI* Gen in diesem Plasmid weist geringe Abweichungen vom ursprünglichen *ARI* Gen (accession number: NM_000044.2) auf. Eine Basenveränderung von G zu C ruft eine Aminosäureveränderung von Histidin zu Glutamin hervor. Außerdem fehlen im Plasmid 36 bp in einem Bereich, der für Glycin-Wiederholungen kodiert. Dadurch fehlen 12 Glycine im resultierenden Protein. Diese Abweichungen wurden schon in den Plasmiden pSGhAR (als Template genutzt) und p423GPDAR1 festgestellt. Da der Androgenrezeptor, wie die Ergebnisse in Kapitel 3.3.2 zeigen funktionell ist, wurde keine erneute Klonierung durchgeführt.

Zusätzlich zum *ARI* wurde die gesamte Kassette aus PGK-Promoter mit AREs und Reporter gen *EGFP* aus dem Plasmid p426PGKEGFP in den Vektor pJR1-3XU mittels der Enzyme *Sph*I und *Xho*I kloniert. Aus dem Vektor wurde vorher der Promoter mit selbigen Enzymen geschnitten. Die Promoter-*EGFP* Kassette wurden mit den Primern *pEGFP_XhoIrev* und *pIPGKAREforSphI* in einer PCR amplifiziert. Der entstandene Vektor wurde zur Kontrolle mit den Sequenzierprimern EGFPprev und EGFP2rev ansequenziert und pJR1-3XUEGFP genannt (Plasmidkarte im Anhang Abbildung 7.7). Die Klonierung der *lacZ*-Kassette aus dem Vektor p426PGKlacZ in das Plasmid pJR1-3XU wurde mehrmals ohne Erfolg versucht. Da das β -Galactosidase-System nur zur Kontrolle in *S. pombe* dienen sollte, wurde diese Klonierung nicht weiter verfolgt und mit dem EGFP-System weitergearbeitet.

Die Plasmide pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP wurden zuerst in den *S. pombe* Stamm HE620 transformiert. Dieser transformierte Stamm zeigte jedoch schon uninduziert eine hohe

Eigenfluoreszenz. Daraufhin wurden die beiden Plasmide in den *S. pombe* Stamm KO110 transformiert. Die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskop zeigte keine Fluoreszenz des nicht induzierten Stammes. Die Transformationen und die Analyse der Fluoreszenz wurden von Felicitas Rataj als studentische Hilfskraft durchgeführt. Mittels Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass der Androgenrezeptor in *S. pombe* KO110 mit den Plasmiden pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP gebildet wird (Abbildung 3.23).

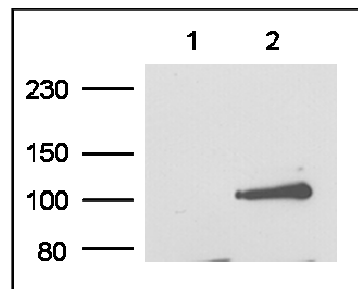


Abbildung 3.23 Immunologischer Nachweis des Androgenrezeptors im konstruierten *S. pombe* Assay. Proteine wurden mittels Y-PER-Reagenz isoliert und gleiche Mengen Proteinprobe der Negativkontrolle (Stamm BY4741 ohne Plasmid) in Spur 1 und des Stammes KO110 mit den Plasmiden pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP in Spur 2 aufgetragen. Der Androgenrezeptor (110 kDa) konnte nachgewiesen werden.

3.3.2 Bestimmung der Kultivierungsbedingungen

Um die optimalen Kultivierungsbedingungen für den *S. pombe* Assay zu bestimmen, wurden verschiedene Zellzahlen (10^4 Zellen, 5×10^4 Zellen und 10^5 Zellen in je 100 μ l Medium pro well) auf einer 96-well Platte eingesetzt, mit verschiedenen DHT-Konzentrationen (10^{-11} M bis 10^{-5} M) induziert und die Fluoreszenz und optische Dichte über einen Zeitraum von 60 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 gezeigt. Dieser Versuch wurde ebenfalls von Frau Felicitas Rataj als studentische Hilfskraft durchgeführt. Je mehr Zellen in den Assay eingesetzt wurden, desto schneller wurde das Signalmaximum erreicht. So wurde bei dem Einsatz von 10^5 Zellen pro well das Signalmaximum schon nach 20 Stunden erlangt. Da aber die höchste DHT-Konzentration bei dieser Zellzahl nicht das maximale Signal brachte, sondern eine Konzentrationsstufe geringer, wurde für die weiteren Versuche eine Zellzahl von 5×10^4 pro well als optimaler Wert eingesetzt. Bei dieser Zellzahl kann nach 24 Stunden gemessen werden, um ein optimales Signal zu bekommen.

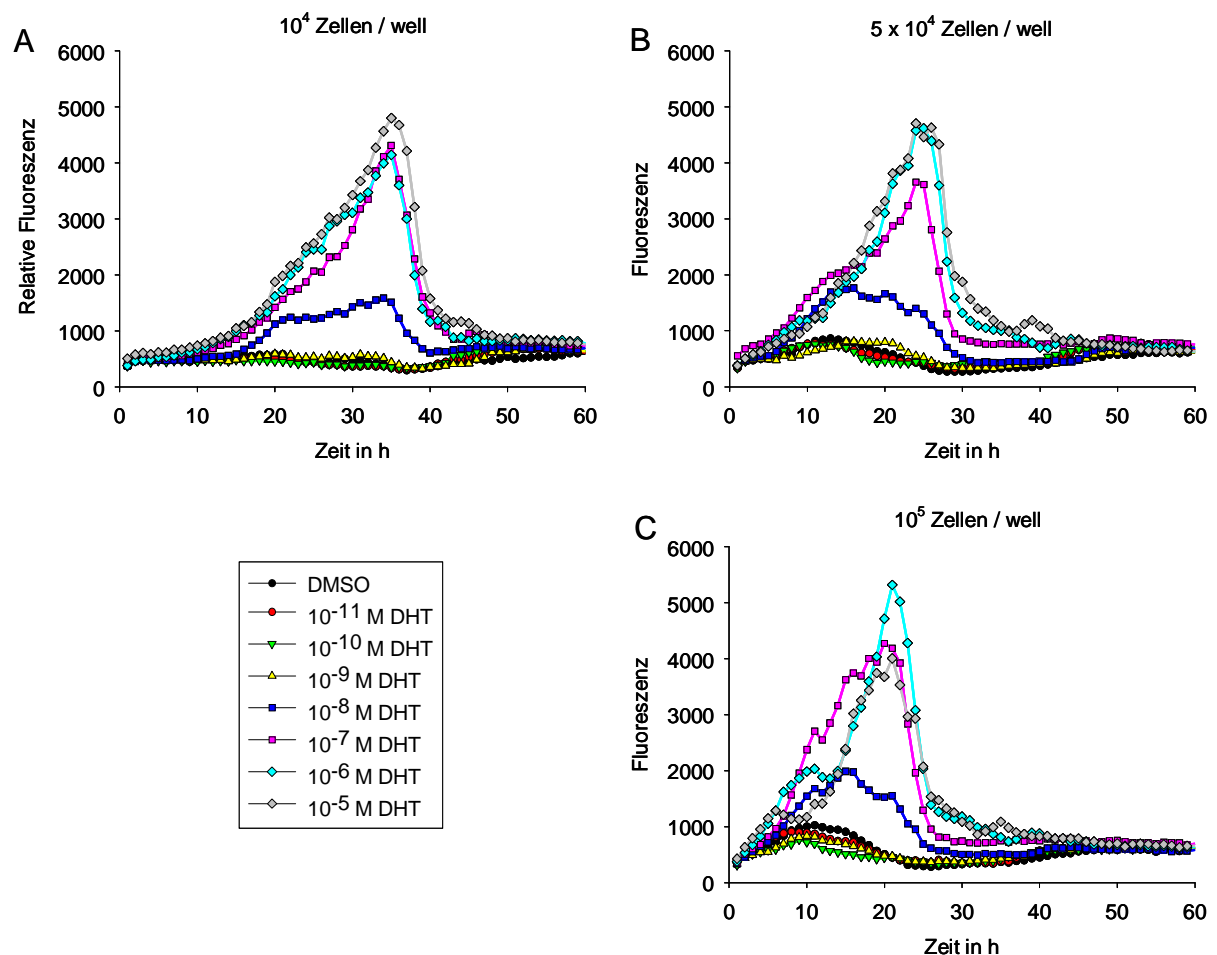


Abbildung 3.24 Test verschiedener DHT-Konzentrationen und Zellzahlen im konstruierten *S. pombe* Assay. Der *S. pombe* Stamm KO110 transformiert mit pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP wurde bei 30°C über 60 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-5} M inkubiert. Die Zellen wurden in drei verschiedenen Zellzahlen (A-C) in den Test eingesetzt.

In Abbildung 3.25 sind die zur Berechnung der relativen Fluoreszenz verwendeten Rohdaten der Fluoreszenz und der Trübung bei einer eingesetzten Zellzahl von 5×10^4 , in Abhängigkeit der Zeit, dargestellt. Es ist zu sehen, dass das Fluoreszenzsignal nach ca. 25 Stunden ein Maximum erreicht und dann extrem abfällt. Die Trübung erreicht erst nach ca. 27 Stunden ein Maximum und verbleibt ca. sieben Stunden in einer Plateauphase, bevor auch die Trübung wieder stark zurückgeht. Die Kurven der relativen Fluoreszenz sind denen der Fluoreszenzrohdaten sehr ähnlich.

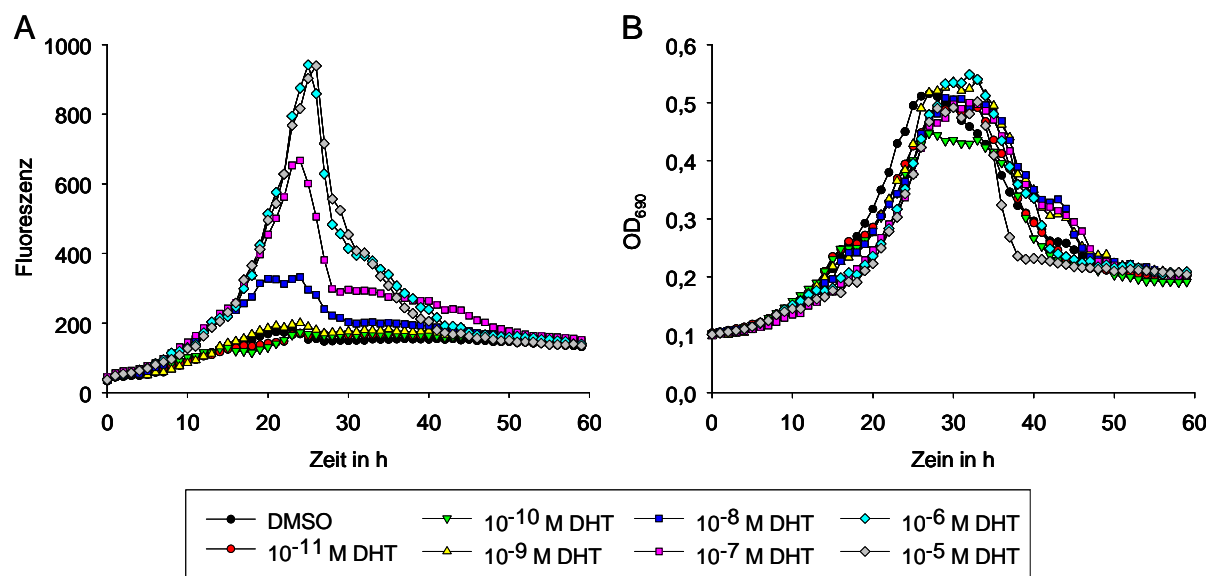


Abbildung 3.25 Fluoreszenz und Trübung des konstruierten *S. pombe* Assays. Der *S. pombe* Stamm KO110 transformiert mit pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP wurde bei 30°C über 48 Stunden mit DHT-Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-5} M und einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen pro well inkubiert. Dargestellt sind die Fluoreszenz (A) und die Trübung (B) als Funktionen der Zeit.

3.4 Hefeassays mit den konstruierten *S. cerevisiae* und *S. pombe* Stämmen

3.4.1 DHT in den konstruierten Hefeassays

Die beiden konstruierten Hefestämme wurden mit DHT in sieben Verdünnungsstufen getestet, um das Signalmaximum, das Signal-Hintergrund-Verhältnis und die Fähigkeit, Androgene zu detektieren, zu bestimmen. Dabei ist nur ein Experiment mit unnormierten Werten in Abbildung 3.26 dargestellt.

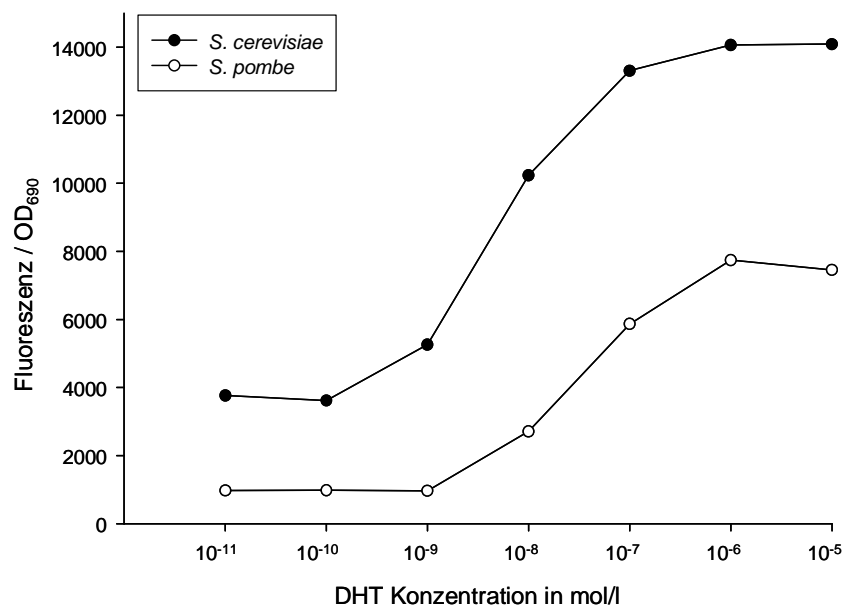


Abbildung 3.26 Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von DHT in den konstruierten Hefeassays. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 mit den Plasmiden p423GPDAR1 und p426PGKEGFP und der *S. pombe* Stamm KO110 mit den Plasmiden pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP wurden mit DHT in Konzentrationen von 10⁻¹¹ M bis 10⁻⁵ M inkubiert. Die Werte wurden nicht normiert.

Der *S. cerevisiae* Assay zeigte ein zweifach höheres Fluoreszenzmaximum bei 14000, aber auch ein vierfach höheres Signalminimum bei 4000 relativen Fluoreszenzeinheiten, als der *S. pombe* Assay (7500 und 1000). Daraus ergibt sich ein Verhältnis von Signalmaximum zu Signalminimum von 3,5:1 für den *S. cerevisiae* Assay und von 7,5:1 für den *S. pombe* Assay. Die Differenz zwischen Signalminimum und -maximum betrug im *S. cerevisiae* Assay ca. 10000 und im *S. pombe* Assay ca. 7000 relative Fluoreszenzeinheiten. Dadurch wurde beim *S. pombe* Assay eine flachere Konzentrations-Wirkungskurve als beim *S. cerevisiae* Assay erzielt. Beide Assays wiesen allerdings eine typische sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurve auf. Die Sensitivität des *S. pombe* Assays war auf die Detektion einer DHT

Konzentration von 10^{-8} M beschränkt, während mit dem *S. cerevisiae* Assay bereits eine DHT- Konzentration von 10^{-9} M erkannt wurde.

3.4.2 Dopingsubstanzen in den konstruierten Hefeassays

In beiden konstruierten Hefeassays wurden die Dopingsubstanzen Boldenon, Mesterolone, Metandienon, Metenolon, Nandrolon, Oxandrolon und Stanozolol getestet. DHT wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

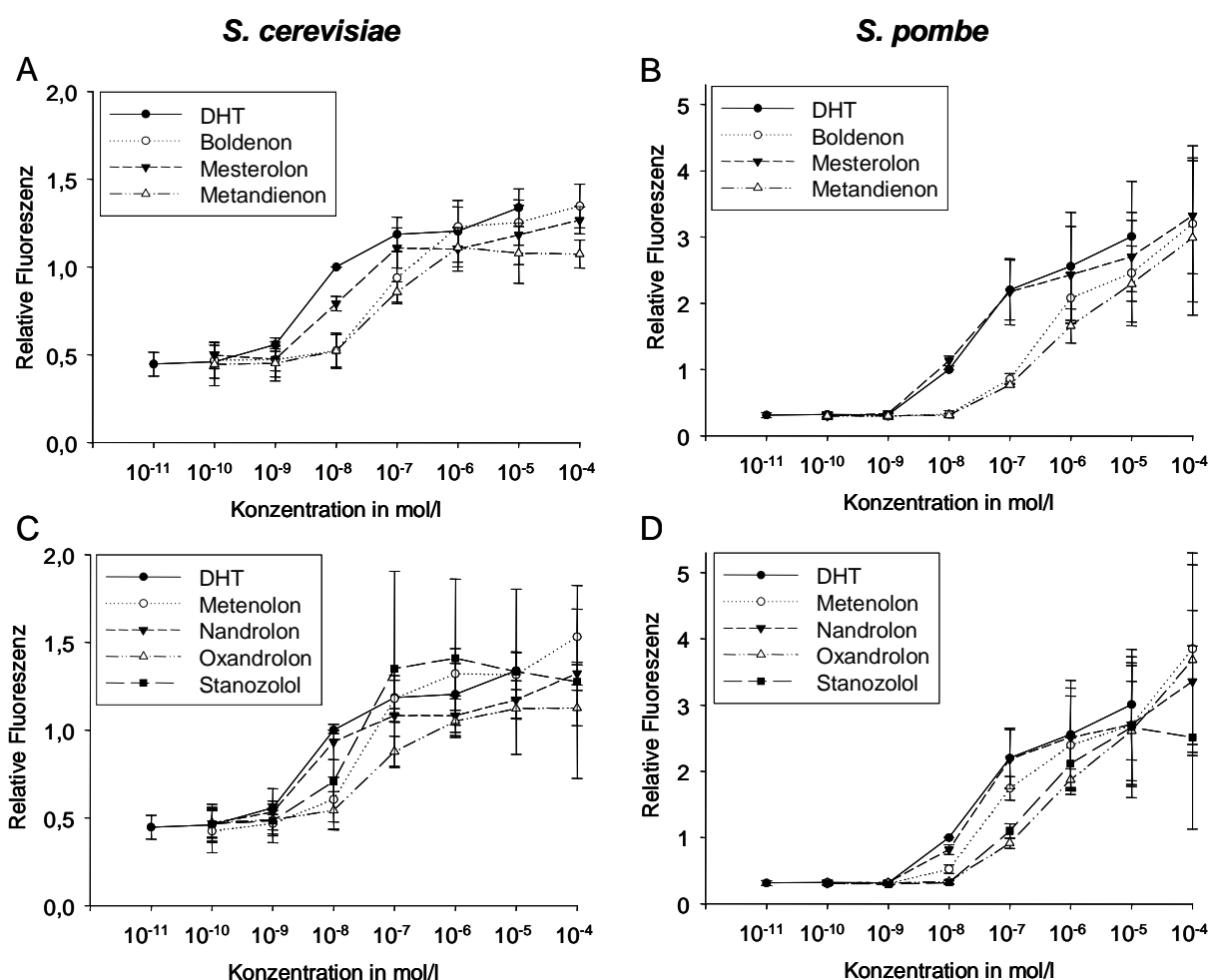


Abbildung 3.27 Konzentrations-Wirkungskurven verschiedener Dopingsubstanzen in den konstruierten Hefeassays. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 mit den Plasmiden p423GPDAR1 und p426PGKEGFP (A, C) und der *S. pombe* Stamm KO110 mit den Plasmiden pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP (B, D) wurden mit DHT, Boldenon, Mesterolone, Metandienon (A, B) und Metenolon, Nandrolon, Oxandrolon und Stanozolol (C, D) in Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-4} M inkubiert.

Die Aktivität aller getesteten Substanzen konnten mit beiden Assays detektiert werden. Mesterolone, Metenolon und Nandrolon zeigten bereits in Konzentrationen ab 10^{-8} M einen Effekt in beiden Assays. Boldenon, Metandienon und Oxandrolon konnten mit beiden Assays

ab einer Konzentration von 10^{-7} M eine Wirkung zeigen. Stanozolol ist die einzige Substanz, die im *S. cerevisiae* Assay in einer 10fach höheren Verdünnung einen Effekt auslöste als im *S. pombe* Assay.

3.4.3 DHT in Sammelurin in den konstruierten Hefeassays

In Sammelurin wurden DHT-Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-4} M eingestellt. Von diesen Urinproben wurden jeweils entweder 10 % oder 20 % zum Hefemedium des *S. cerevisiae* und *S. pombe* Assays gegeben. Dadurch wurde bei der Zugabe von 20 % Urin ins Medium die doppelte Menge DHT zugegeben als bei der Zugabe von 10 % Urin. Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abbildung 3.28 dargestellt.

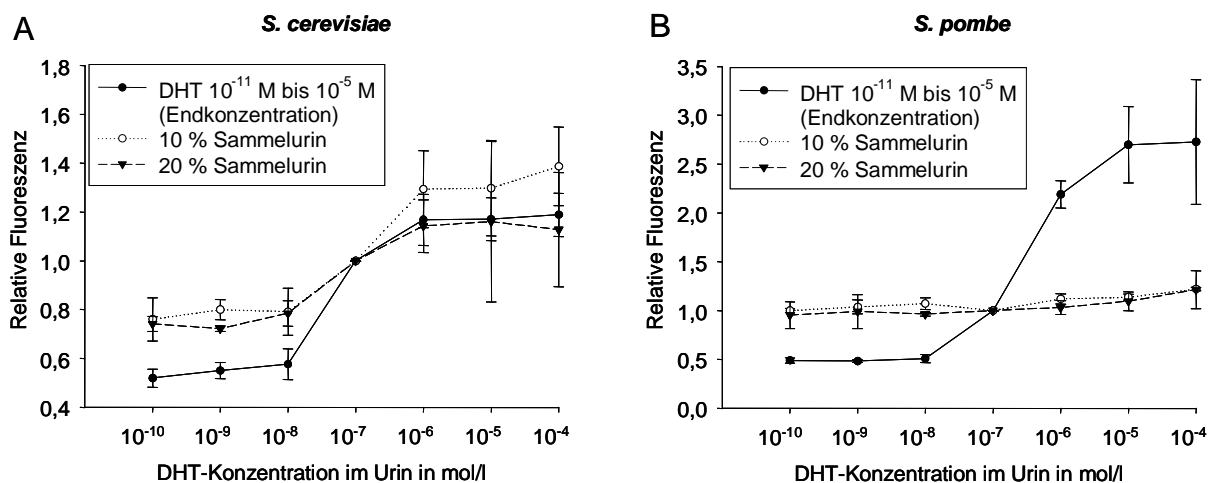


Abbildung 3.28 Konzentrations-Wirkungskurven von 10 % oder 20 % Urin mit DHT in den konstruierten Hefeassays. Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungskurven von 10 % oder 20 % Urin mit DHT-Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-4} M im Vergleich zu DHT ohne Urin im *S. cerevisiae* (A) und *S. pombe* (B) Reportergensystem. Dabei entspricht die übereinander aufgetragene DHT-Konzentration ohne Urin der DHT-Konzentration beim Einsetzen von 10 % Sammelurin (Verdünnungsfaktor 0,1) im Hefemedium.

Im *S. cerevisiae* Assay zeigten beide Urinkonzentrationen eine Differenz vom Signalmaximum zum -minimum von mindestens 0,44 relativen Fluoreszenzeinheiten. Die DHT Konzentrations-Wirkungskurve ohne Urin weist eine Differenz vom Signalmaximum zum -minimum von 0,67 relativen Fluoreszenzeinheiten auf. Durch Zugabe von 10 % Urin mit entsprechenden DHT-Konzentrationen wurde ein stärkeres Signal erzielt als durch die Zugabe von 20 % Urin, obwohl durch Zugabe von 20 % Urin die absolute DHT-Konzentration im Medium verdoppelt wurde. Durch Zugabe von 10 % oder 20 % Urin zum

S. pombe Assay ging die Antwort der Hefen auf DHT im Vergleich zu DHT ohne Urin sehr stark zurück. Die Differenz zwischen Signalmaximum und -minimum betrug unter Zugabe von 10 % Urin ins Hefemedium nur noch 0,22 relative Fluoreszenzeinheiten. Bei der DHT Konzentrations-Wirkungskurve ohne Urin betrug diese Differenz 2,24. Eine Plateau-Phase der Konzentrations-Wirkungskurven ist nicht mehr zu erkennen. Auch weisen die beiden unterschiedlichen Urinkonzentrationen keine bedeutenden Unterschiede auf. Da im *S. cerevisiae* Assay bei 10 % Urin im Hefemedium ein stärkeres Signal detektiert werden konnte, wurde für weitere Versuche, auch für den *S. pombe* Assay, diese Urinkonzentration gewählt.

3.4.4 Trenbolox-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays

In den konstruierten *S. cerevisiae* und *S. pombe* Assays wurde der gleiche Ausscheidungsversuch getestet, wie im Sumpter Assay. Allerdings wurde in den neu konstruierten Assays 10 % Urin eingesetzt und nicht wie im Sumpter Assay 20 %. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 gezeigt. *S. pombe* zeigte wie schon in vorherigen Versuchen ein sehr geringes DHT-abhängiges Signal (A), wohingegen im *S. cerevisiae* Assay eine Konzentrations-Wirkungskurve erzielt wurde. In beiden Assays zeigte die Referenzprobe bei Zeitpunkt 0 ein sehr geringes Signal. Die Proben von 3:40 bis 21:20 Stunden lagen im *S. pombe* Assay alle über dieser Kontrolle, wobei 19:10 Stunden nach Substanzeinnahme das stärkste Signal zu beobachten war. Im *S. cerevisiae* Assay lagen alle Proben, außer zum Zeitpunkt 10:45 über dem Wert der Referenzprobe bei Zeitpunkt 0. Auch hier wurde das stärkste Signal nach 19:10 Stunden detektiert.

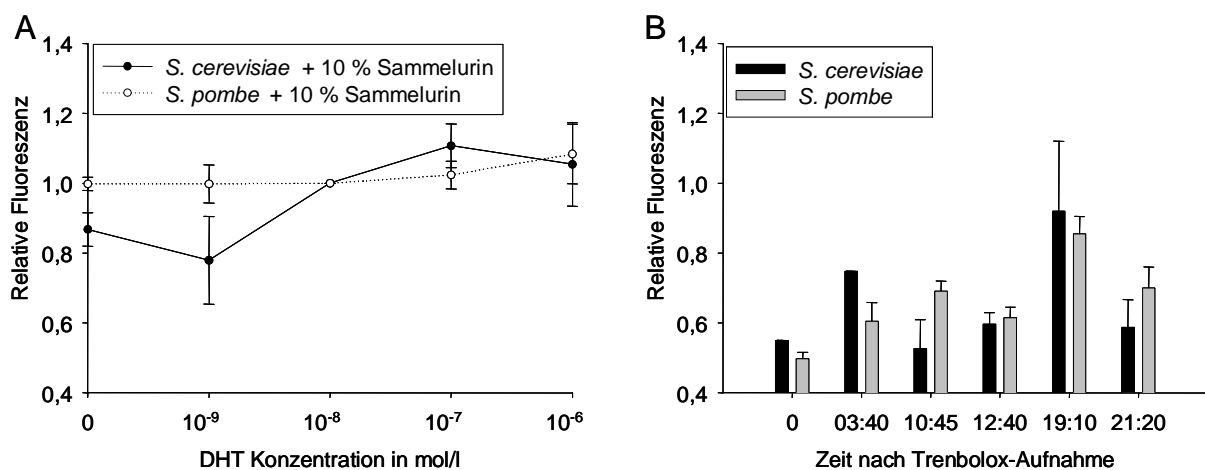


Abbildung 3.29 Trenbolox-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays. Es wurden je 10 % Urin im Hefemedium eingesetzt. Tren 0 ist eine Urinprobe zur Zeit der Einnahme von einer Kapsel Trenbolox entsprechend ca. 25 mg Estra-4,9-dien-3,17-dion (Referenzprobe). Die nachfolgenden Urinproben Tren 1 bis Tren 5 wurden in zeitlicher Abfolge innerhalb 24 Stunden nach Substanzeinnahme gesammelt. DHT in Sammelurin wurde als Positivkontrolle mitgeführt (A).

Auffällig ist, dass die Referenzprobe im Trenbolox-Ausscheidungsversuch mit einer relativen Fluoreszenz von 0,55 im *S. cerevisiae* und mit 0,50 im *S. pombe* Assay deutlich unter den Werten von Sammelurin ohne DHT liegen. Daher konnten die Urinproben nach Substanzeinnahme des Trenbolox-Ausscheidungsversuchs nur mit der versuchsinternen Referenzprobe verglichen werden.

3.4.5 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays

Der bereits im Sumpter Assay untersuchte Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch wurde ebenfalls in den beiden konstruierten Hefeassays getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.30 und Abbildung 3.31 dargestellt. Im konstruierten *S. cerevisiae* Assay wurden 25 von 46 Proben und im *S. pombe* Assay sechs von 46 mit einem Fluoreszenzsignal größer als 120 % der Referenzprobe als positiv detektiert. Eine Korrelation zwischen der Signalstärke und den Morgenurinen bei 21 h, 43,5 h, 69,5 h, 94 h, 118 h, 143 h, 165,5 h, 187 h, 210,5 h und 234,5 h war bei beiden Assays nicht erkennbar.

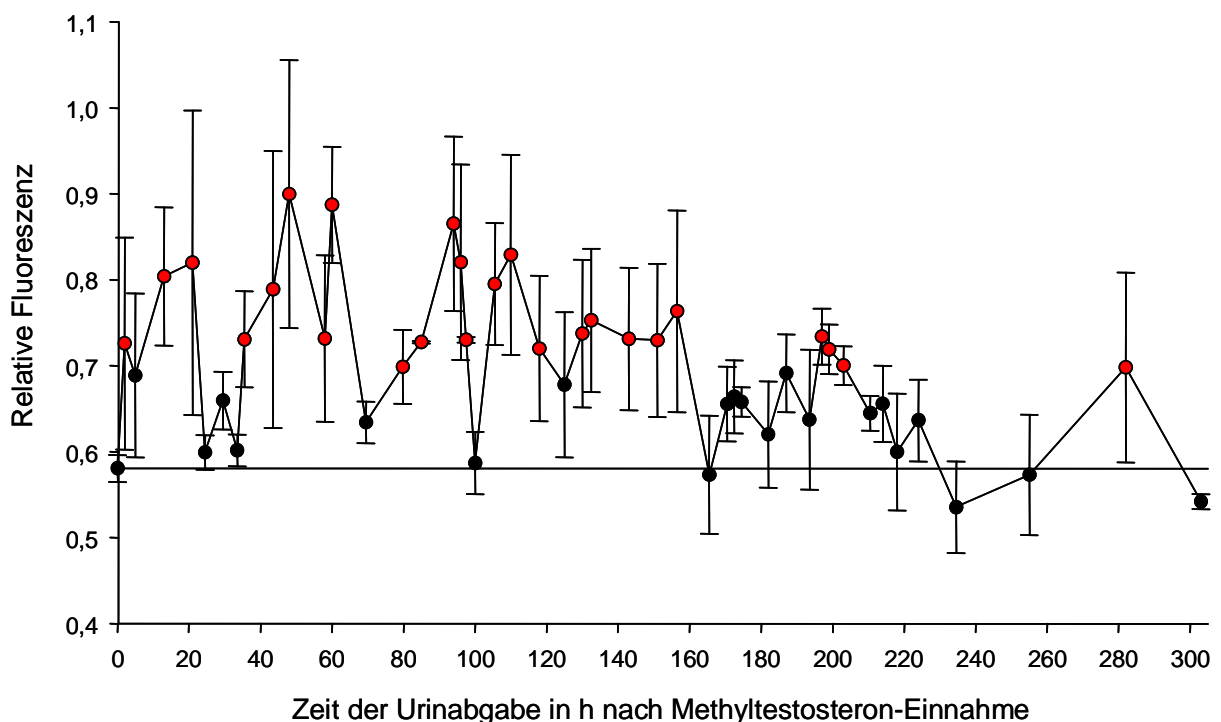


Abbildung 3.30 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im konstruierten *S. cerevisiae* Assay. Es wurden 10 % Urin im Hefemedium eingesetzt. Zum Zeitpunkt 0 wurden 5 mg Methyltestosteron von einem Freiwilligen oral eingenommen. Der Wert dieser Urinprobe wurde als Referenzprobe verwendet und ist im Diagramm durch eine Gerade markiert. Rot markierte Werte mit einer Fluoreszenz größer 0,6968 (120 % des Referenzwertes) wurden als positiv gewertet.

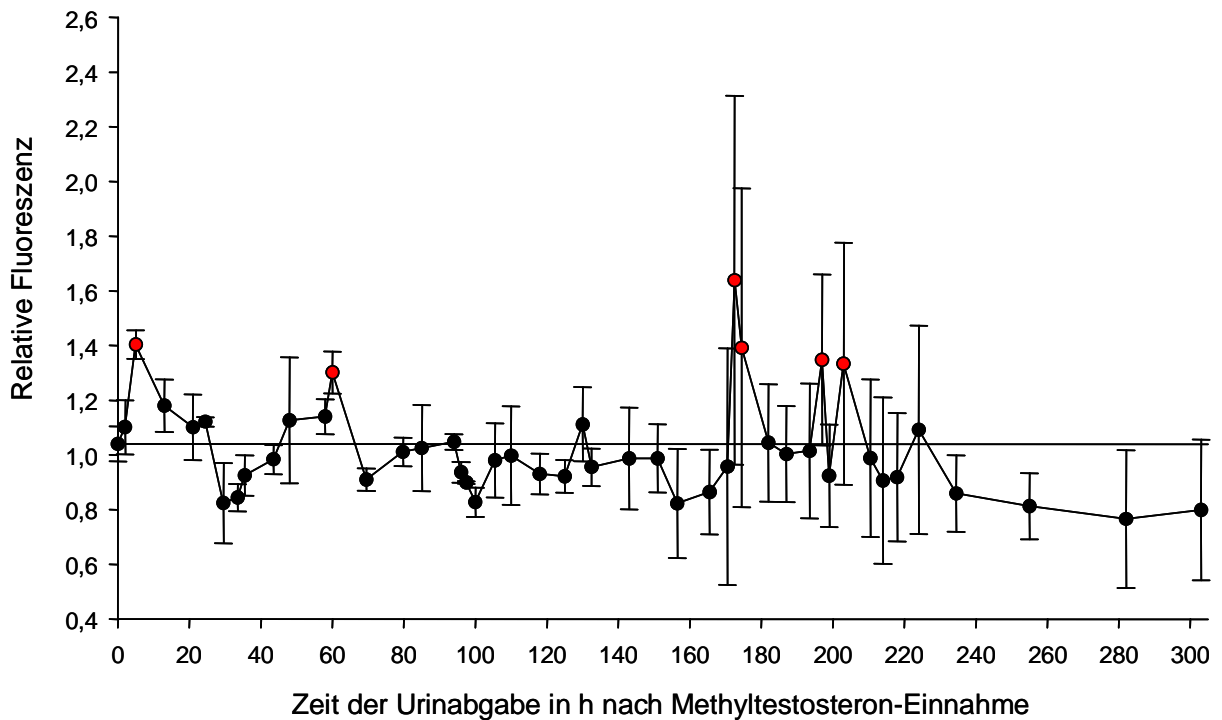


Abbildung 3.31 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im konstruierten *S. pombe* Assay. Es wurden 10 % Urin im Hefemedium eingesetzt. Zum Zeitpunkt 0 wurden 5 mg Methyltestosteron von einem Freiwilligen oral eingenommen. Der Wert dieser Urinprobe wurde als Referenzprobe verwendet und ist im Diagramm durch eine Gerade markiert. Rot markierte Werte mit einer Fluoreszenz größer 1,25 (120 % des Referenzwertes) wurden als positiv gewertet.

In Tabelle 3.2 sind zusammenfassend die positiv detektierten Urinproben in Abhängigkeit von der Zeit nach Substanzeinnahme, auch im Vergleich zu den Ergebnissen des Sumpter Assays (Kapitel 3.1.1.5) dargestellt.

Tabelle 3.2 Vergleich des Methyltestosteron-Ausscheidungsversuchs im Sumpter Assay, im konstruierten *S. cerevisiae* und im konstruierten *S. pombe* Assay. Der positive Nachweis von bestimmten Urinproben nach Einnahme von Methyltestosteron ist durch ein Kreuz markiert.

Stunden nach Substanzeinnahme	Urinvolumen in ml	Sumpter Assay	konstruierter <i>S. cerevisiae</i> Assay	konstruierter <i>S. pombe</i> Assay
0	100			
2	150		x	
5	150	x		x
13	280		x	
21	100	x	x	
24,5	110			
29,5	170	x		
33,5	140	x		
35,5	30	x	x	
43,5	140	x	x	
48	120	x	x	
58	250		x	
60	160	x	x	x
69,5	210			
79,75	200	x	x	
85	110	x	x	
94	210	x	x	
96	100	x	x	
97,5	190		x	
100	150	x		
105,5	200	x	x	
110	100	x	x	
118	190	x	x	
125	250	x		
130	220	x	x	
132,5	110	x	x	
143	240	x	x	
151	230	x	x	
156,5	75	x	x	
165,5	240	x		
170,5	230			
172,5	200			x
174,5	200			x
182	240	x		
187	200	x		
193,5	240	x		
197	220		x	x
199	130	x	x	
203	90	x	x	x
210,5	180	x		
214	190			
218	240	x		
224	220	x		
234,5	272	x		
251-260	240	x		
281-284	180	x	x	
299-307	240	x		

3.4.6 1-Androsteron-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays

In den konstruierten Hefeassays wurden Urinproben eines 1-Androsteron-Ausscheidungsversuches getestet. Außerdem wurde die Reinsubstanz in Sammelurin in beiden Hefeassays eingesetzt (Abbildung 3.32).

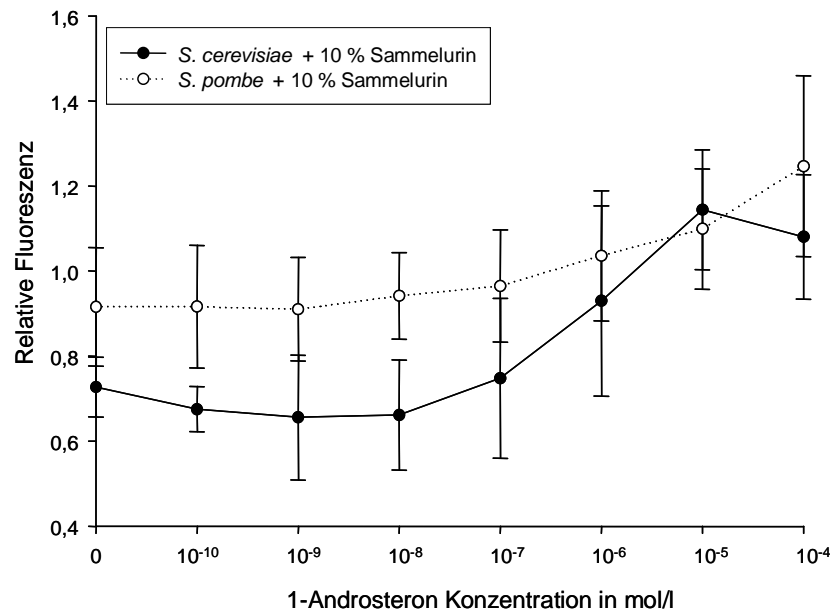


Abbildung 3.32 Konzentrations-Wirkungskurve von 1-Androsteron in den konstruierten Hefeassays mit 10 % Sammelurin im Hefemedium.

Im *S. cerevisiae* Assay konnte die Aktivität der Reinsubstanz 1-Androsteron gut nachgewiesen werden, wobei das höchste Signal bei einer Konzentration von 10^{-5} M erreicht wurde. Im *S. pombe* Assay verläuft die Konzentrations-Wirkungskurve von 1-Androsteron in Sammelurin sehr flach. Es ist aber eine Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit zu erkennen. Dieser flache Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve konnte auch schon für DHT festgestellt werden (Abbildung 3.29 A). Die Ergebnisse der in die Hefeassays eingesetzten Urinproben sind in der Abbildung 3.33 und Abbildung 3.34 dargestellt. Auch in diesem Versuch zeigte die Urinprobe vor Substanzeinnahme ein deutlich geringeres relatives Fluoreszenzsignal (0,68 im *S. cerevisiae* und 0,58 im *S. pombe* Assay), als 10 % Sammelurin ohne DHT. Deshalb wurden die Urinproben nach Substanzeinnahme nur mit der Urinprobe vor Substanzeinnahme verglichen. Es wurden alle Urinproben als positiv gewertet, die eine Signalstärke von 120 % im Vergleich zur Referenzprobe aufwiesen, das war im *S. cerevisiae* Assay eine relative Fluoreszenz größer als 0,8 und im *S. pombe* Assay größer als 0,7.

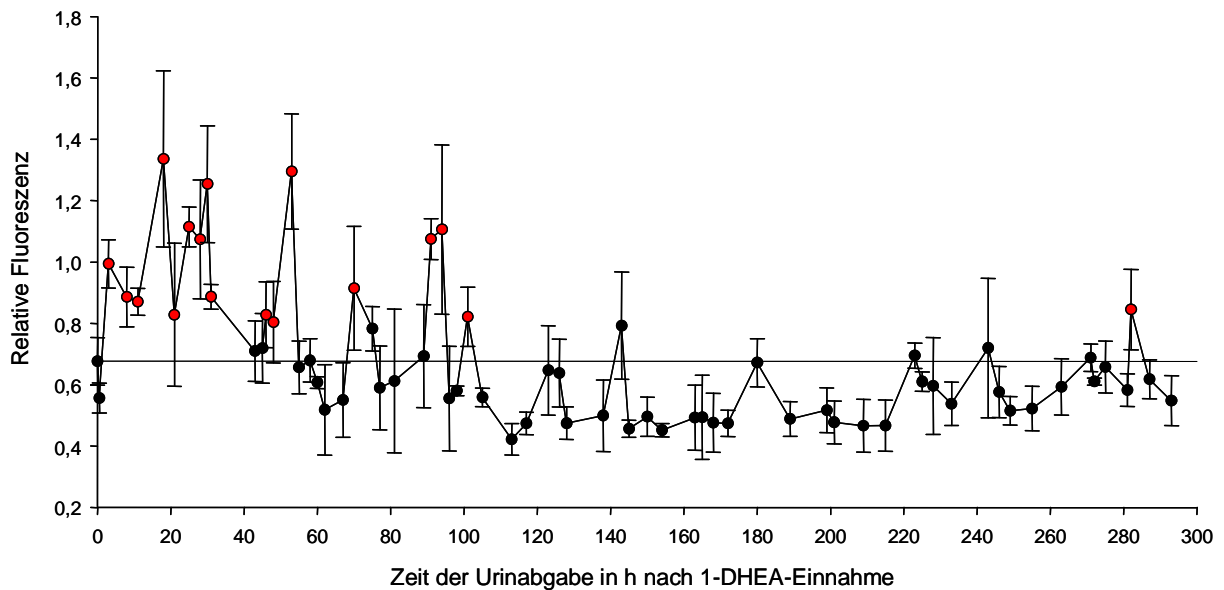


Abbildung 3.33 1-Androsteron-Ausscheidungsversuch im *S. cerevisiae* Assay. Es wurden je 10 % Urin im Hefemedium eingesetzt. Zeitpunkt 0 ist eine Urinprobe zur Zeit der Einnahme von ca. 115 mg 1-Androsteron. Der Wert dieser Urinprobe wurde als Referenzprobe verwendet und ist durch eine Linie im Diagramm dargestellt. Rot markierte Werte mit einer relativen Fluoreszenz größer als 0,8 wurden als positiv gezählt, schwarz markierte dagegen als negativ.

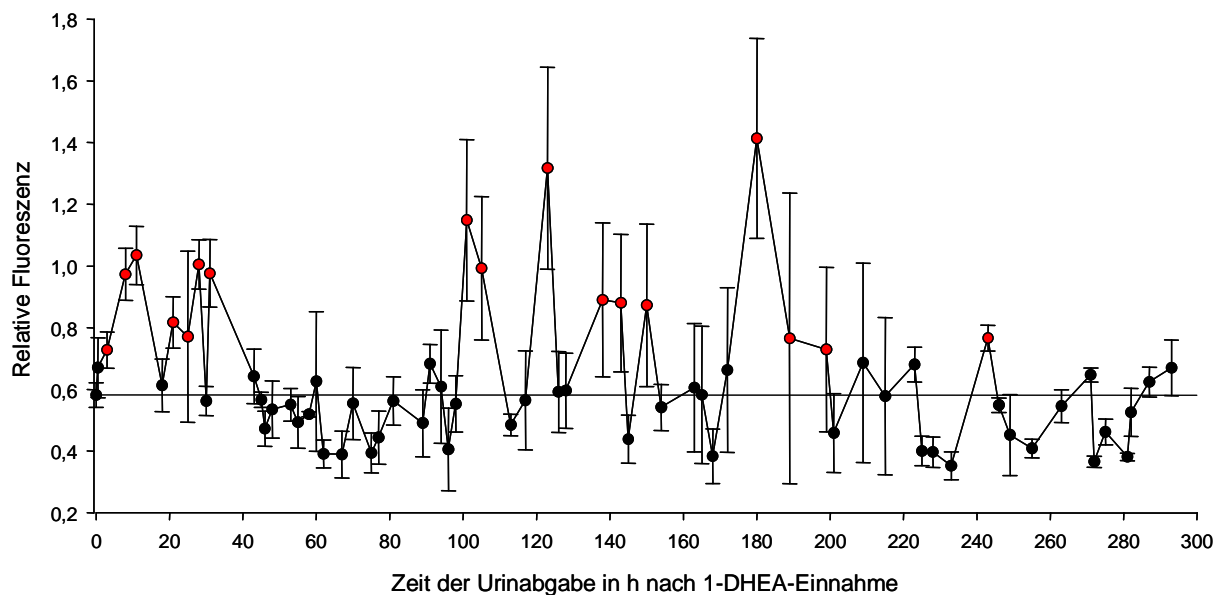


Abbildung 3.34 1-Androsteron-Ausscheidungsversuch im *S. pombe* Assay. Es wurden je 10 % Urin im Hefemedium eingesetzt. Zeitpunkt 0 ist eine Urinprobe zur Zeit der Einnahme von ca. 115 mg 1-Androsteron. Der Wert dieser Urinprobe wurde als Referenzprobe verwendet und ist durch eine Linie im Diagramm dargestellt. Rot markierte Werte mit einer relativen Fluoreszenz größer als 0,7 wurden als positiv gezählt, schwarz markierte dagegen als negativ.

Die Urinproben des Ausscheidungsversuchs zeigten in beiden konstruierten Hefeassays unterschiedliche Ergebnisse. Die Urinprobe bei 0,5 Stunden nach Substanzeinnahme zeigte in beiden Assays kein Signal. Die Urinproben von drei bis 31 Stunden konnten in *S. cerevisiae* alle und in *S. pombe* mit den Ausnahmen der Urinproben nach 18 und 30 Stunden als positiv detektiert werden. Die folgenden Urinproben von 46 bis 101 Stunden nach Substanzeinnahme wurden vorwiegend vom *S. cerevisiae* und die Urinproben von 101 bis 233 Stunden nach Substanzeinnahme hauptsächlich vom *S. pombe* Assay erkannt. Die letzte positiv getestete Probe wurde mittels des *S. cerevisiae* Assays im Urin 282 Stunden nach Substanzeinnahme detektiert. Eine Korrelation zwischen der Signalstärke und den Morgenurinen bei 18, 43, 89, 113, 163, 209 und 255 Stunden war bei beiden Assays nicht erkennbar. Ausgeschiedene Ausgangssubstanz bzw. deren Metabolite wurden bis 28 Stunden nach Substanzeinnahme von beiden Assays gut erkannt. Im mittleren Zeitfenster konnte *S. cerevisiae* und im späten Zeitfenster *S. pombe* die Metabolite im Urin besser detektieren. Dieser Sachverhalt ist in Tabelle 3.3 gut zu erkennen.

Tabelle 3.3 Vergleich des 1-Androsteron Ausscheidungsversuchs im *S. cerevisiae* und *S. pombe* Reporter-genassay. Der positive Nachweis von bestimmten Urinproben nach Einnahme von 1-Androsteron ist durch ein Kreuz markiert.

Stunden nach Substanzeinnahme	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Stunden nach Substanzeinnahme	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
0,5			126		
3	x	x	128		
8	x	x	138		x
11	x	x	143		x
18	x		145		
21	x	x	150		x
25	x	x	154		
28	x	x	163		
30	x		165		
31	x	x	168		
43			172		x
45			180		x
46	x		189		x
48	x		199		
53	x		201		
55			209		
58			215		
60			223		
62			225		
67			228		
70	x		233		x
75			243		
77			246		
81			249		
89			255		
91	x		263		
94	x		271		
96			272		
98			275		
101	x	x	281		
105		x	282	x	
113			287		
117			293		
123		x			

3.4.7 Antiandrogene und Naringeninderivate in den konstruierten Hefeassays

Um zu testen, ob die konstruierten Hefeassays auch Antiandrogene erkennen, wurden die Antiandrogene Flutamid, Nilutamid und Bicalutamid und die Naringeninderivate 8-PN und 6-DMAN allein oder unter Zusatz von 10^{-8} M DHT im *S. cerevisiae* oder 5×10^{-8} M DHT im *S. pombe* Assay eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.35 dargestellt.

Im androgenen Test zeigte nur 6-DMAN in einer Konzentration von 10^{-5} M einen Effekt im *S. cerevisiae* Assay. 6-DMAN und 8-PN waren in Konzentrationen von 10^{-4} M toxisch für beide Hefen. Dies zeigte sich durch eine OD_{690} unter 0,1. Diese Werte wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Im antiandrogenen Test zeigten Flutamid und Nilutamid in beiden Hefeassays eine schwache Wirkung in einer Konzentration von 10^{-4} M. Für Bicalutamid konnte in beiden Assays keine antiandrogene Wirkung nachgewiesen werden. 8-PN zeigte unterschiedliche Effekte in beiden Hefeassays: keinen antiandrogenen Effekt im *S. cerevisiae* Assay, aber einen schwachen Effekt im *S. pombe* Assay bei einer Konzentration von 10^{-5} M. Für 6-DMAN konnte in beiden Hefeassays eine antiandrogene Wirkung bei einer Konzentration von 10^{-5} M gezeigt werden. Dabei ist der Effekt deutlich ausgeprägter im *S. pombe* Assay als im *S. cerevisiae* Assay zu erkennen. 6-DMAN zeigte im *S. pombe* Assay nur antiandrogene und im *S. cerevisiae* Assay androgene und sehr geringe antiandrogene Eigenschaften.

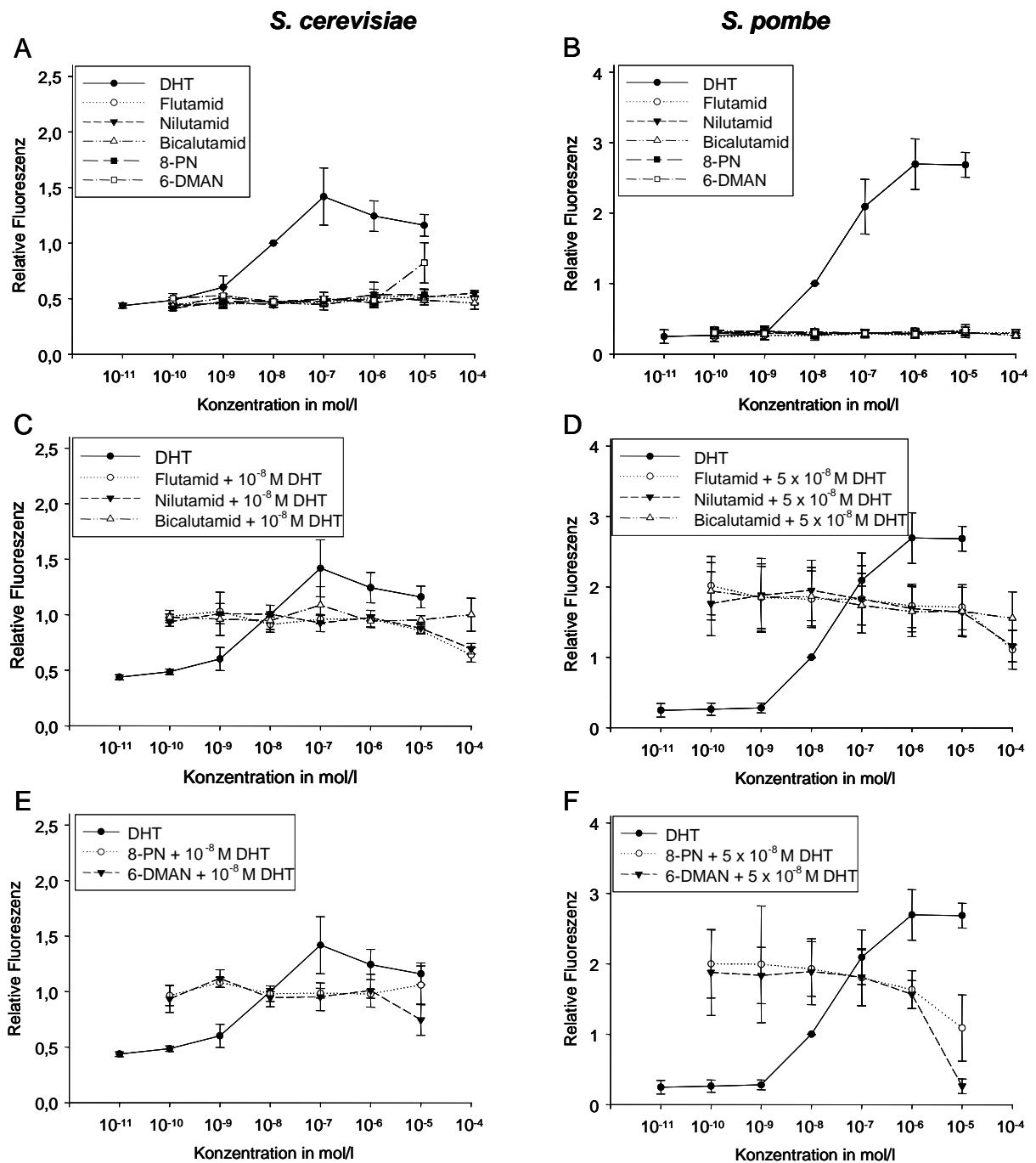


Abbildung 3.35 Konzentrations-Wirkungskurven verschiedener Antiandrogene in den konstruierten Hefeassays. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 mit den Plasmiden p423GPDAR1 und p426PGKEGFP (A, C, E) und der *S. pombe* Stamm KO110 mit den Plasmiden pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP (B, D, F) wurde mit den Antiandrogenen Flutamid, Nilutamid, Bicalutamid, 8-prenylnaringenin (8-PN) und 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin (6-DMAN) in Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-4} M inkubiert um androgene Effekte zu detektieren (A, B) und unter zusätzlicher Zugabe von 10^{-8} M bzw. 5×10^{-8} M DHT um antiandrogene Effekte zu erkennen (C, D, E, F).

3.4.8 SARMs in den konstruierten Hefeassays

Des Weiteren wurden zwei SARMs in beiden Hefeassays getestet, die vom Institut für Biochemie der Sporthochschule Köln synthetisiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.36 dargestellt.

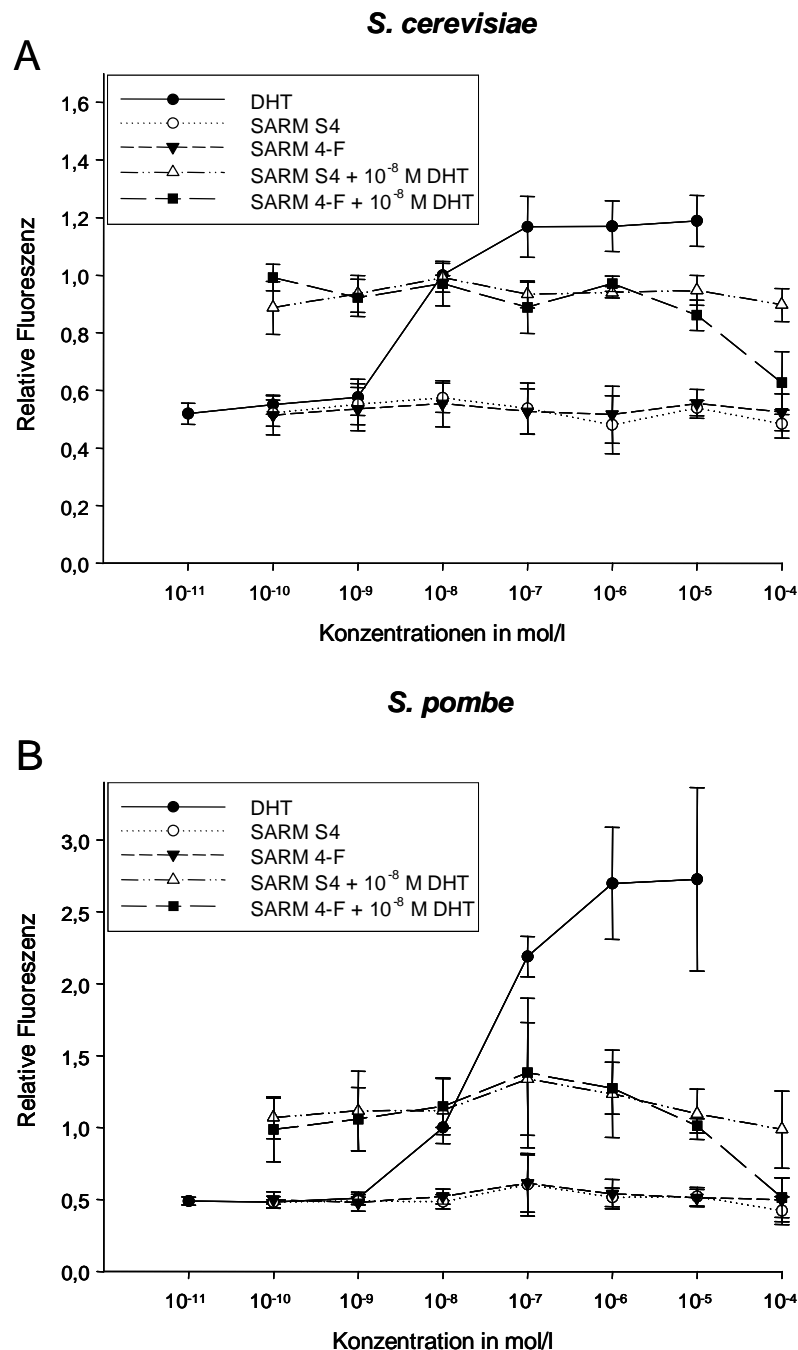


Abbildung 3.36 Konzentrations-Wirkungskurven zweier SARMs in den konstruierten Hefeassays. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4741 mit den Plasmiden p423GPDAR1 und p426PGKEGFP (A) und der *S. pombe* Stamm KO110 mit den Plasmiden pJR1-3XLAR1 und pJR1-3XUEGFP (B) wurde mit den SARMs S4 und 4-F in Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-4} M inkubiert um androgene Effekte zu detektieren und unter zusätzlicher Zugabe von 10^{-8} M DHT um antiandrogene Effekte zu erkennen.

Im androgenen Test konnte in beiden Assays kein Effekt der SARMS festgestellt werden. Im antiandrogenen Test zeigte nur das SARM 4-F in beiden Hefeassays einen ähnlich starken Effekt. Die DHT-Wirkung konnte vollständig antagonisiert werden, allerdings erst in einer Konzentration von 10^{-4} M. Das SARM S4 zeigte in beiden Assays keine Wirkung.

3.4.9 EC50 der getesteten Substanzen in den konstruierten Hefeassays

Die EC50 Werte wurden mittels SigmaPlot 9.0 bestimmt und sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungskurven nicht aufgeführter Substanzen (oder n.a.) konnten hinsichtlich des EC50 nicht ausgewertet werden, da kein annähernd sigmoidaler Kurvenverlauf erkennbar war. Bei Werten mit Ausrufezeichen wurden die Plateau-Phasen der Konzentrations-Wirkungskurven nicht vollständig erreicht. Deshalb ist es fraglich, ob der EC50 aus diesen Kurven mathematisch korrekt berechnet werden kann.

Tabelle 3.4 EC50 Werte der getesteten Substanzen in den konstruierten *S. cerevisiae* und *S. pombe* Assays (n.a., nicht auswertbar). Bei nicht aufgeführten Substanzen konnte der EC50 Wert nicht bestimmt werden. Bei Werten mit Ausrufezeichen hat die Konzentrations-Wirkungskurve der Substanz kein Plateau erreicht. Es ist fraglich, ob bei diesen Kurven der EC50 Wert mathematisch korrekt berechnet werden kann.

Substanz	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. pombe</i>	
	EC50 in mol/l	StAbw	EC50 in mol/l	StAbw
DHT	$5,20 \times 10^{-9}$	$4,20 \times 10^{-9}$	$3,27 \times 10^{-8}$!	$1,32 \times 10^{-8}$
Boldenon	$8,02 \times 10^{-8}$	$1,78 \times 10^{-8}$	$6,71 \times 10^{-7}$!	$4,22 \times 10^{-7}$
Mesterolone	$1,29 \times 10^{-8}$	$9,05 \times 10^{-8}$	$3,63 \times 10^{-8}$!	$4,56 \times 10^{-8}$
Metandienon	$6,18 \times 10^{-8}$	$1,19 \times 10^{-8}$	$1,63 \times 10^{-6}$!	$8,79 \times 10^{-7}$
Metenolon	$3,66 \times 10^{-8}$	$2,04 \times 10^{-8}$	$9,61 \times 10^{-7}$!	$2,26 \times 10^{-6}$
Nandrolon	$4,89 \times 10^{-9}$	$1,82 \times 10^{-8}$	$4,73 \times 10^{-8}$!	$4,27 \times 10^{-8}$
Oxandrolon	$6,41 \times 10^{-8}$	$1,11 \times 10^{-8}$	$4,43 \times 10^{-6}$!	$4,94 \times 10^{-6}$
Stanozolol	$1,34 \times 10^{-8}$	$5,74 \times 10^{-8}$	$2,05 \times 10^{-7}$	$4,90 \times 10^{-8}$
6-DMAN + 5×10^{-8} M DHT	n.a.	n.a.	$3,03 \times 10^{-6}$!	$6,08 \times 10^{-6}$
SARM 4-F + 10^{-8} M DHT	$1,12 \times 10^{-5}$!	$6,47 \times 10^1$	$1,15 \times 10^{-5}$!	$8,93 \times 10^1$

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung und genetische Veränderung des Sumpter Hefeassays

Die Standardmethode, um den Missbrauch anaboler Steroide zu detektieren ist die Gaschromatographie oder Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie bzw. Tandemmassenspektrometrie. Mit diesen Methoden können unbekannte Substanzen allerdings nur schwer detektiert werden. Auch ist diese Nachweismethode sehr zeit- und kostenintensiv. Jedoch stellt sie die einzige Methode dar die absolut quantifizieren kann und gerichtsrelevant ist. Weitere Nachweismethoden beruhen auf dem Nachweis der biologischen Aktivität von Substanzen. Dadurch können auch Stoffe mit unbekannter chemischer Struktur nachgewiesen werden, indem sie einen biologischen Effekt durch die Bindung an den natürlichen Rezeptor auslösen. Zu diesen Systemen gehören auch Reporteragenassays in der Hefe. Vorteile von hefebasierten Assays sind ihre einfache Handhabung, die geringen Kosten und ihre Robustheit gegenüber toxischer Eigenschaften von Testsubstanzen.

4.1.1 Hefeassays mit dem original Sumpter Stamm

In dieser Arbeit werden zwei neue Hefeassays in *S. cerevisiae* und *S. pombe* zum Nachweis androgener Substanzen konstruiert und hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit in der Doping-*Prescreening* Analyse geprüft. Als Voruntersuchung wurde ein bereits bestehendes System, der von Sohoni und Sumpter (1998) zum Nachweis androgener und antiandrogener Kontaminationen in Umweltproben entwickelte hefebasierte Reporteragenassay dahingehend geprüft, ob er den Missbrauch anaboler Steroide in Urinproben, Antiandrogene oder sogar SARMs detektieren kann. Für den Einsatz dieses Reporteragenassays zum Nachweis des Missbrauchs anaboler Steroide muss das Testverfahren verschiedene Kriterien erfüllen. Zum einen muss die Aktivität von Dopingsubstanzen und deren mit dem Urin ausgeschiedener Metabolite nachzuweisen sein. Zum anderen sollte die Aktivität androgener Substanzen mit einer höheren Spezifität mittels dieses Tests nachgewiesen werden, als die Aktivität von Substanzen anderer Steroidklassen. Außerdem wäre es für den Nachweis des Missbrauchs anaboler Steroide in Urinproben von Vorteil, wenn der Assay bestimmte Urinkonzentrationen toleriert. Urinproben ohne exogene Zufuhr und mit physiologisch normalen Konzentrationen an androgenen Steroiden sollten dabei nicht als positiv detektiert werden, wohingegen Urinproben mit exogen zugeführten androgenen Steroiden ein deutliches Signal im Hefeassay zeigen sollten.

4.1.1.1 Dopingsubstanzen und deren Metabolite im Sumpter Hefeassay

Um zu testen, ob der Sumpter Hefeassay in der Lage ist die Aktivität dopingrelevanter Substanzen anzuzeigen, wurden häufige Dopingsubstanzen und einige Metabolite in den Assay eingesetzt (Kapitel 3.1.1.1). Alle Doping-Ausgangssubstanzen Metandienon, Boldenon, Mesterolone, Metenolon, Nandrolon, Oxandrolon und Stanozolol zeigten eine gute Aktivität im Hefeassay. Die Metaboliten Boldenon M1, Mesterolone M1, Metenolon M1, Nandrolon M1, Stanozolol M1 und Stanozolol M3 konnten ebenfalls einen Effekt ab mindestens einer Konzentration von 10^{-6} M im Hefeassay auslösen. Allerdings zeigten auch einige Metabolite, namentlich Metandienon M2, M3 und M4 und Nandrolon M2 nur einen schwachen Effekt ab einer Konzentration von 10^{-5} M und Oxandrolon M1 ab einer Konzentration von 10^{-4} M. Keinen Effekt zeigte Stanozolol M4 in den getesteten Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-4} M. Mittels dieser Ergebnisse konnte jedoch gezeigt werden, dass der Hefeassay prinzipiell durch Dopingsubstanzen und deren Metabolite aktiviert wird. Nach Einnahme einer anabolen androgenen Substanz werden meist die Ausgangssubstanz selbst und mehrere verschiedene Metabolite der eingenommenen Substanz mit dem Urin ausgeschieden. Somit könnte der Hefeassay trotzdem ein positives Signal mit Urinproben eines Ausscheidungsversuchs zeigen, auch wenn nicht alle ausgeschiedenen Metaboliten das Reportergen aktivieren.

4.1.1.2 Nicht-androgene Steroide und DHEA im Sumpter Hefeassay

Anschließend wurden unter gleichen Versuchsbedingungen die nicht-androgenen Steroide Aldosteron (Mineralocorticoid), Progesteron (Gestagen), Dexametason (künstliches Glucocorticoid) und 17β -Östradiol (Östrogen) getestet. Außerdem wurde das Prohormon Dehydroepiandrosteron, eine Vorstufe für Testosteron und 17β -Östradiol in den Hefeassay eingesetzt (Kapitel 3.1.1.2). Abgesehen von 17β -Östradiol und Progesteron zeigten diese Substanzen keinen oder nur einen sehr schwachen Effekt im Hefeassay.

In der Literatur wurde beschrieben, dass 17β -Östradiol mit geringer Sensitivität an den Androgenrezeptor binden kann (Yeh et al., 1998). Dies ist wahrscheinlich auf die ähnliche Struktur der Ligandenbindungsdomäne des Östrogen- und des Androgenrezeptors zurückzuführen. Der humane Östrogenrezeptor α weist eine 22 %ige Aminosäuresequenzhomologie in der Ligandenbindungsdomäne zum humanen Androgenrezeptor auf (Gao et al., 2005). Beim Östrogenrezeptor β beträgt diese Übereinstimmung in der Ligandenbindungsdomäne sogar 25 % (Gao et al., 2005). Außerdem

konnte für 17β -Östradiol gezeigt werden, dass es zusammen mit Östron abhängig vom Menstruationszyklus in nicht schwangeren Frauen in Konzentrationen von $5,3 \times 10^{-8}$ M bis $14,6 \times 10^{-8}$ M im Urin vorliegt (Patricot et al., 1986). In den Hefeassays wurden Urinproben zu maximal 20 % eingesetzt. Dadurch wurde der Urin eins zu fünf verdünnt. Die Konzentration, die resultierend aus diesen Werten maximal im Hefeassay vorliegt, beträgt somit ca. 3×10^{-8} M 17β -Östradiol plus Östron. Im Hefetest zeigte 17β -Östradiol in einer Konzentration von 10^{-8} M keinen und in einer Konzentration von 10^{-7} M einen schwachen Effekt. Die berechnete Konzentration im Hefeassay liegt zwischen diesen Werten. Physiologische 17β -Östradiol Konzentrationen sollten demnach keinen oder nur einen sehr geringen Effekt im androgenen Hefeassay auslösen. Dies konnte auch durch den Einsatz von 20 % Urin von Frauen in den Hefeassay gezeigt werden (Kapitel 3.1.1.3).

Von Progesteron ist ebenfalls bekannt, dass eine Bindung an den Androgenrezeptor stattfinden kann (Bardin et al., 1983). Die Ligandenbindungsdomäne des humanen Progesteronrezeptors ist zu 55 % in ihrer Aminosäuresequenz mit dem Androgenrezeptor identisch (Gao et al., 2005). Progesteron zeigte im androgenen Hefeassay ein Signal ab einer Konzentration von 10^{-7} M. In der Schwangerschaft wird Progesteron verstärkt gebildet (Campbell, 1998). Im Urin schwangerer Frauen konnte eine Progesteronkonzentration von ca. 20×10^{-8} M (64 ng/ml) nachgewiesen werden (Kjeld et al., 1980). Da der Urin im Hefeassay wiederum eins zu fünf verdünnt wurde, beträgt die Konzentration im Hefemedium ca. 4×10^{-8} M Progesteron. Eine Progesteronkonzentration von 10^{-8} M zeigte im Hefeassay keine und eine Progesteronkonzentration von 10^{-7} M einen geringen Effekt. Die berechnete Progesteronkonzentration, die im Hefemedium durch Zugabe von 20 % Urin einer schwangeren Frau anfällt, liegt zwischen diesen beiden Werten. Urinproben schwangerer Frauen sollten demnach, wie unsere Ergebnisse auch zeigten (Kapitel 3.1.1.3), bis zu einer Urinkonzentration von 20 % im Hefemedium keinen oder nur einen schwachen Effekt auslösen. Nicht-androgene Steroide in physiologischen Konzentrationen bewirken demnach keinen oder nur einen sehr schwachen Effekt im androgenen Hefeassay.

4.1.1.3 Urinproben von Frauen und Männern im Sumpter Hefeassay

Im Sumpter Hefeassay wurden zwölf Urinproben ohne exogene Zugabe von Androgenen analysiert. Dadurch sollte der Hintergrund von Urinproben bestimmt werden. Außer einer weiblichen Urinprobe (7w mit relativer Absorption bei 20 % Urin von 0,36) lagen alle gemessenen Absorptionswerte bei Zugabe von 20 % Urin zum Hefemedium sehr niedrig

(unter 0,22). Der Proband, der die Urinprobe 7w abgegeben hat ist afrikanischer Abstammung (Kamerun). Hinweise in der Literatur deuten darauf hin, dass schwarze Frauen einen höheren Testosteronspiegel im Blut aufweisen als weiße Frauen (Aloia et al., 1998; Morsink et al., 2007). Die höhere relative Absorption der Urinprobe 7w könnte auf diese Unterschiede zurückzuführen sein. Da jedoch eine zweite Urinprobe dieser Versuchsperson das erste Ergebnis nicht bestätigen konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Experimente zu Unterschieden in Urinproben von weißen und schwarzen Personen durchgeführt.

4.1.1.4 Trenbolox-Ausscheidungsversuch im Sumpter Hefeassay

Des Weiteren wurden Urinproben eines Trenbolox-Ausscheidungsversuchs (Kapitel 3.1.1.4) getestet. Die Urinproben dieses Versuchs wiesen eine deutlich höheres Signal (mind. 0,61 relative Absorptionseinheiten) im Vergleich zur Referenzprobe (0,23 relative Absorptionseinheiten) und zu den Urinproben ohne exogene Zufuhr von Androgenen (bis maximal 0,36 relative Absorptionseinheiten, vgl. Kapitel 3.1.1.3) auf. Die Intensität des Signals war dabei 3:40 Stunden nach Substanzaufnahme am stärksten und ging dann zurück. Mögliche Gründe für diesen Rückgang könnten eine schnelle Metabolisierung von Estra-4,9-dien-3,17-dion im Körper und eine schnelle Ausscheidung von Estra-4,9-dien-3,17-dion bzw. seiner Metabolite mit dem Urin sein. Vorstellbar wäre außerdem, dass später mit dem Urin ausgeschiedene Metaboliten aus den Hefezellen transportiert werden und somit nicht nachgewiesen werden können oder diese Metaboliten nicht oder nicht in ausreichenden Mengen in die Hefezellen gelangen. In den Urinproben nach Substanzeinnahme konnten mittels Massenspektrometriemethodik Estra-4,9-dien-3,17-dion in geringen Mengen und mehrere Metabolite, darunter auch der Hauptmetabolit 17 β -Hydroxyestra-4,9-dien-3-on und Norandrosteron nachgewiesen werden (Parr et al., 2008). Dabei konnte 17 β -Hydroxyestra-4,9-dien-3-on in allen fünf Urinproben nach Substanzeinnahme aufgezeigt werden. Norandrosteron überstieg sogar den WADA-Grenzwert von 2 ng/ml in den zwei Urinproben bis 10:45 Stunden nach Substanzeinnahme (Parr et al., 2008). Dabei konnten Norandrosteronkonzentrationen von 400 ng/ml in der 3:40 h und 20 ng/ml in der 10:45 h Urinprobe festgestellt werden. Weitere Werte zu den Ausscheidungskinetiken der anderen Metabolite sind in der Literatur nicht gezeigt. Im Hefeassay zeigten die beiden Urinproben (3:40 und 10:45 Stunden), die den WADA-Grenzwert überstiegen, auch einen starken Effekt und sogar eine größere relative Absorption als 10⁻⁶ M DHT im Hefemedium. Norandrosteron

in Urinkonzentrationen über dem von der WADA für positive Dopingbefunde festgelegten Grenzwert können demnach sehr gut mit diesem Hefeassay nachgewiesen werden. Der Urin-Sammelzeitraum ist jedoch mit 24 Stunden sehr kurz. Eventuelle Langzeitmetabolite konnten somit nicht nachgewiesen werden. Es wurde aber festgestellt, dass dem Körper exogen zugeführte androgene Steroide mit diesem Hefeassay im Urin nachgewiesen werden können und der Hefeassay 20 % Urin im Medium toleriert. Außerdem zeigte der Assay bei normalen Urinproben ohne exogene Zufuhr von androgenen Steroiden und bei mehreren getesteten nicht-androgenen Steroiden in physiologischen Konzentrationen keinen oder nur einen sehr geringen Effekt. Die niedrige Absorption von Urinproben ohne exogene Zufuhr von Androgenen lässt den Schluss zu, dass der Hefeassay nicht wesentlich durch die Anwesenheit körpereigener Steroidhormone oder anderer Urininhaltsstoffe beeinflusst wird. Somit sind grundlegende Bedingungen erfüllt, den androgenen Reporteragenassay auch für den Dopingnachweis nutzen zu können.

4.1.1.5 Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch im Sumpter Hefeassay

Im Sumpter Assay wurde außerdem ein Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch untersucht (Kapitel 3.1.1.5). Werte, die mindestens 120 % des Signals der Referenzprobe zeigten, wurden dabei als positiv gewertet. Aufgrund eines zu geringen Stichprobenumfangs konnte keine Signifikanzanalyse durchgeführt werden (vgl. Kapitel 2.2.5.1). Da anzunehmen ist, dass einige Werte rein zufällig und nur mit einem geringen Betrag über dem Wert der Referenzprobe liegen, wurde diese Grenze von 120 % eingeführt, um nicht alle Werte, welche diejenigen der Referenzprobe übersteigen, als positiv zu deklarieren. Die Ergebnisse zeigen, dass der Sumpter Assay den Missbrauch von Methyltestosteron bis 307 Stunden nach Substanzeinnahme im Großteil der Urinproben aufzeigen kann. Allerdings konnten 11 von 46 Proben (2 h, 13 h, 24,5 h, 58 h, 69,5 h, 97,5 h, 170,5 h, 172,5 h, 174,5 h, 197 h und 214 h nach Substanzeinnahme) nicht als positiv detektiert werden. Die Urinproben dieses Ausscheidungsversuchs wurden parallel mittels GC-MS am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln analysiert (Wolf et al., 2010). Dabei lag das zeitliche Detektionslimit für Methyltestosteron bzw. seine Metabolite im Urin bei ca. 118 Stunden nach Substanzeinnahme. Absolute Konzentrationen der detektierten Substanzen wurden mittels GC-MS jedoch nicht ermittelt. Der Unterschied im Nachweis mittels Sumpter Assay und GC-MS Methodik könnte damit erklärt werden, dass die klassische Methode die Ausgangssubstanz und spezifische Metabolite nachweist, während der Hefeassay die Summe

aller im Urin vorhandenen bekannten und unbekannten Metabolite detektiert. Sechs (2 h, 13 h, 24,5 h, 58 h, 69,5 h und 97,5 h nach Substanzeinnahme) der positiven Ergebnisse mittels GC-MS wurden im Hefeassay nicht als positiv erkannt. Dies könnte pharmakokinetisch begründet werden. Im Urin 2 Stunden nach Substanzeinnahme wurden wahrscheinlich zu geringe Mengen der Ausgangssubstanz bzw. der Metabolite ausgeschieden. Auch in den fünf anderen durch den Hefeassay nicht als positiv detektierten Urinproben ist wahrscheinlich die Konzentration von Methyltestosteron bzw. seiner Metabolite zu gering um die Reportergenaktivität zu induzieren. Eine mögliche Erklärung wäre ein relativ großes Urinvolumen bei den Urinproben 13 h, 58 h und 69,5 h nach Substanzeinnahme (280 ml, 250 ml und 210 ml im Vergleich zum Durchschnitt von 179,5 ml) oder eine relativ kurze Zeitspanne zwischen zwei Urinabgaben bei den Proben 24,5 h und 97,5 Stunden nach Substanzeinnahme (3,5 h bzw. 1,5 h), wodurch der Urin in diesen Fällen verdünnt wird (Wolf et al., 2010). Eine zu geringe Konzentration von Methyltestosteron bzw. seiner Metabolite könnte auch bei den Urinproben 170,5 h, 172,5 h, 174,5 h, 197 h und 214 h nach Substanzeinnahme die Ursache für den negativen Test im Sumpter Assay sein. Allerdings könnten auch einige Metabolite mit geringerer Sensitivität nachgewiesen werden als andere. Je nachdem welche Metabolite zu welchem Zeitpunkt ausgeschieden werden wird ein schwaches oder starkes Reportergensignal im Hefeassay induziert.

4.1.1.6 Effekte der Urinaufarbeitung im Sumpter Hefeassay

Bisher wurden unbehandelte Urinproben in den Hefeassay eingesetzt. Eine Konzentrierung der im Urin enthaltenen androgenen Steroide und die Entfernung von eventuell störenden Urinbestandteilen könnte die Sensitivität des Hefeassays erhöhen. Deshalb wurde der Effekt einer gezielten Vorbereitung von Urinproben durch Etherextraktion und die Reinigung über Festphasenextraktions-Säulen im Hefeassays getestet (Kapitel 3.1.1.6). Bei der Urinbehandlung durch Etherextraktion wurden einzelne Urinbestandteile zehnfach und bei der Reinigung über Festphasenextraktions-Säulen zwanzigfach aufkonzentriert.

Nach der Urinaufarbeitung mittels Festphasenextraktions-Säulen konnte ein sehr starkes Signal bereits nach Zugabe von nur 2 % Eluat festgestellt werden. Allerdings konnte kaum ein Unterschied zwischen Sammelurin mit, beziehungsweise ohne Zugabe von 10^{-9} M DHT erzielt werden.

Nach einer Etherextraktion konnte ein höheres Signal bei der Zugabe von 20 % Sammelurin mit 10^{-8} M (1,15 relative Fluoreszenzeinheiten) und 10^{-9} M (0,64 relative

Fluoreszenzeinheiten) DHT detektiert werden, als bei den Urinproben ohne Etherextraktion (0,37 bzw. 0,17 relative Fluoreszenzeinheiten). Durch eine Etherextraktion sollten die im Urin enthaltenen androgenen Steroide 10fach konzentriert werden. Das Signal konnte aber nur etwa um den Faktor drei bis vier gesteigert werden. Auch ruft bereits eine Etherextraktion bei Sammelurin ohne DHT-Zugabe einen Signalanstieg nach Zugabe von 20 % Urin hervor (von 0,17 auf 0,44 relative Fluoreszenzeinheiten). Da Urinproben ohne Zugabe von DHT nach einer Urinbehandlungen bereits ein Signal in dem Hefeassay zeigten, ist es empfehlenswert unbehandelte Urinproben in den Test einzusetzen, was außerdem einen großen Vorteil in Bezug auf Kosten und Testgeschwindigkeit darstellt.

Um Bakterienwachstum in Urinproben zu verhindern wird dem Urin oft Natriumazid zugesetzt (Thongboonkerd und Saetun, 2007). Dadurch kann auch der Abbau von Steroiden im Urin verhindert werden (Ayotte, 2010). Deshalb wurde die Auswirkung von Natriumazidzusatz zu Urinproben im Hefeassay getestet (Kapitel 3.1.1.6). Dabei wurde festgestellt, dass die Zugabe von Natriumazid das Hefewachstum hemmt und sich somit negativ auf den Hefeassay auswirkt. Um das Natriumazid aus den Urinproben wieder zu entfernen, könnte vor dem Hefeassay eine Etherextraktion oder eine Reinigung über Festphasenextraktions-Säulen durchgeführt werden. Dies wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da keine der genannten Urinbehandlungen eine erhebliche Verbesserung in der Signalauswertung erbracht haben.

4.1.1.7 Antiandrogene, Naringeninderivate und SARMs im Sumpter Hefeassay

Weitere Substanzklassen die an den Androgenrezeptor binden können sind unter anderem Antiandrogene und SARMs. Beispielhaft für diese Substanzklassen wurden die drei Antiandrogene Flutamid, Nilutamid und Bicalutamid, die zwei SARMs S4 und 4-F und außerdem die zwei prenylierten Naringeninderivate 6-DMAN und 8-PN getestet (Kapitel 3.1.1.7 und 3.1.1.8). Alle 3 Antiandrogene konnten den androgenen Effekt von DHT vollständig antagonisieren. Somit konnte ihre antiandrogene Wirkung in diesem Hefeassay bestätigt werden. In einem anderen *S. cerevisiae* Hefeassay konnte hingegen die antiandrogene Wirkung von Bicalutamid nicht nachgewiesen werden (Bovee et al., 2010). Das Naringeninderivat 6-DMAN erwies sich ab einer Konzentrationen ab 10^{-5} M und das Naringeninderivat 8-PN in einer Konzentration von 10^{-4} M toxisch für die Hefen. Für 6-DMAN konnte in Konzentrationen bis 10^{-6} M keine antiandrogene Wirkung nachgewiesen

werden. Das Naringeninderivat 8-PN zeigte einen schwachen antiandrogenen Effekt bei einer Konzentration von 10^{-5} M. Eine androgene Wirkung konnte für die zwei getesteten Naringeninderivate mit diesem Hefeassay, wie bereits durch Zierau et al. (2003) gezeigt, nicht festgestellt werden. Allerdings wurde von Zierau et al. für beide Naringeninderivate eine starke antiandrogene Wirkung im Sumpter Hefeassay gezeigt (Zierau et al., 2003). Es wurden jedoch keine toxischen Effekte dieser zwei Substanzen angesprochen. Wenn die Hefen in hohen Substanzkonzentrationen nicht wachsen oder sterben, wird unabhängig vom Vorhandensein einer androgenen Substanz keine β -Galactosidase gebildet und im Hefemedium kann kein Farbumschlag registriert werden. Als Referenz wird im Sumpter Assay die Trübung der Hefesuspension (OD_{690}) gemessen und dieser Wert vom Messwert des Farbumschlags subtrahiert. Durch diese Berechnung in der Auswertung des Sumpter Assays wird ein Absterben oder kein Wachstum der Hefen nicht ausreichend berücksichtigt. Deshalb müsste ein Grenzwert für die Trübung festgelegt werden, um falsche antiandrogene Effekte auszuschließen. Eine Division des Messwertes durch den Referenzwert würde diesen Effekt möglicherweise auch besser berücksichtigen.

Die Ergebnisse der drei im Assay getesteten Antiandrogene bestätigen die in der Literatur beschriebene Fähigkeit dieses Hefeassays, antiandrogene Eigenschaften von Substanzen nachzuweisen (Kolle et al., 2010).

SARMs sind Substanzen, die den Androgenrezeptor nur in ihren spezifischen Zielorganen aktivieren, ohne eine Wirkung in anderen Organen hervorzurufen. Idealerweise wirken SARMs als Antagonist in Zielgeweben wie dem Muskel und Knochen, sollten aber keine agonistische oder sogar eine antagonistische Wirkung im Prostatagewebe zeigen. Solche Eigenschaften machen sie für den Missbrauch im Doping interessant. Ein Nachweis der Aktivität von SARMs mittels Hefeassay im Doping-*Prescreening* wäre demnach vorteilhaft. Aufgrund der Eigenschaften von SARMs wären im Hefeassay androgene Effekte, antiandrogene Effekte oder beide Effekte zu erwarten. Im Sumpter Assay konnte für die beiden getesteten SARMs S4 und 4-F kein androgener und nur für das SARM 4-F ein geringer antiandrogener Effekt gezeigt werden. Die zwei in dieser Arbeit eingesetzten SARMs wurden bereits von Bovee et al. (2010) in einem anderen EGFP-basierten Hefeassay getestet. Dabei konnte kein androgener aber für beide SARMs ein antiandrogener Effekt bei Zugabe von 7×10^{-8} M Testosteron nachgewiesen werden (Bovee et al., 2010). Das SARM 4-F war bei einer Konzentration von 2×10^{-5} M und das SARM S4 bei einer Konzentration von 10^{-5} M in der Lage den Effekt von 7×10^{-8} M Testosteron vollständig zu antagonisieren. Der Effekt von 10^{-6} M Testosteron konnte allerdings durch beide SARMs nicht antagonisiert

werden. EC50 Werte wurden für die Effekte der SARMS jedoch nicht angegeben. Im Sumpter Hefeassay konnte nur für das SARM 4-F ab einer Konzentration von 10^{-5} M ein schwacher antiandrogener Effekt nach Zugabe von 10^{-8} M DHT gezeigt werden (Kapitel 3.1.1.8). Zum einen könnten diese Unterschiede im Nachweis an den verschiedenen Hefeassays liegen. Es wurden in beiden Assays unterschiedliche Hefeausgangsstämme, unterschiedliche Ausgangsplasmide und unterschiedliche androgen responsive Promotoren mit zwei (Bovee et al., 2007) bzw. drei ARE (Sumpter Assay, Kapitel 3.1.2) verwendet. Außerdem wurden bei beiden Assays unterschiedliche androgene Substanzen eingesetzt. Im Hefeassay von Bovee et al. wurde Testosteron und in dieser Arbeit wurde DHT im Sumpter Assay als zu antagonisierende Substanz verwendet. DHT wirkt stärker androgen als Testosteron (vgl. Kapitel 1.3). Eine Antagonisierung von Testosteron im Vergleich zu DHT ist deshalb mit einer geringeren Konzentration an antiandrogener Substanz möglich. Die SARMS weisen wahrscheinlich zu geringe antiandrogene Eigenschaften auf, um im Sumpter Assay eine DHT-Konzentration von 10^{-8} M zu antagonisieren. Eine geringere DHT Konzentration könnte möglicherweise antagonisiert werden. Dies wurde allerdings im Umfang dieser Arbeit nicht untersucht. Es wäre außerdem von Vorteil noch weitere SARMS im Sumpter Hefeassay zu testen, um zu untersuchen ob auch andere SARMS ein Signal im Hefeassay hervorrufen.

4.1.2 Charakterisierung des Sumpter Plasmids

Bei dem im Sumpter Assay verwendeten Reportergen *lacZ* muss die gebildete β -Galactosidase sekretiert und ein im Medium vorliegendes Substrat von einem gelben in einen roten Farbstoff umgewandelt werden. Dabei dauert es ca. 48 Stunden bis ein gut messbares Signal generiert wird. Ein Austausch des Reportergens zu *EGFP* (optimiertes grün fluoreszierendes Protein) verspricht eine wesentlich kürzere Inkubationszeit, da EGFP sehr schnell von der Zelle gebildet werden kann und nicht ins Medium sekretiert werden muss, um ein messbares Signal zu bilden. Durch eine kürzere Inkubationszeit könnten mehr Proben im gleichen Zeitrahmen analysiert werden. In der Doping *Prescreening*-Analyse zum Beispiel könnte somit ein größerer Probenumfang mit geringeren Personal- und Energiekosten pro Probe untersucht werden.

Um das Sumpter Plasmid genetisch verändern zu können wurde es zunächst charakterisiert (Kapitel 3.1.2). Dadurch konnte gezeigt werden, dass dieses Plasmid mit etwa 13 kb sehr groß ist (p416PGKlacZ z.B. ca. 9 kb groß) und in der multiplen Klonierungsstelle enthaltene Schnittstellen für Restriktionsenzyme oft mehr als einmal im Plasmid schneiden. Eine

Klonierung in dieses Plasmid ist daher erschwert.

Der PGK-Promoter im Plasmid wurde von Sohoni und Sumpter (1998) dahingehend verändert, dass die Bindungsregion für Transkriptionsaktivatoren durch drei AREs ersetzt wurde. Dadurch wurde die Induktion des Promoters abhängig vom Vorhandensein Liganden-aktivierter Androgenrezeptoren. Auf dem Plasmid konnte außerdem das Gen für die ATP-abhängige Permease identifiziert werden, welches die Aufnahme von Sterol in die Hefezelle begünstigt (Sullivan et al., 2009). Dieser Fakt würde dafür sprechen, das Sumpter Plasmid genetisch zu verändern. Wegen der erschwerten Klonierung in das Sumpter Plasmid bedingt durch seine Größe und fehlender Restriktionsschnittstellen wurden zwei Klonierungsstrategien verfolgt. Zum einen wurde versucht in das Sumpter Plasmid zu klonieren und parallel wurden übliche Hefepasmide zur Klonierung verwendet (Kapitel 3.1.3).

4.1.3 Klonierung des PGK-Promoters, *EGFP* und *lacZ* in den Sumpter Hefen

Im Sumpter Plasmid wurde das *lacZ* Gen durch das *EGFP* Gen ersetzt. Durch fehlende geeignete Restriktionsschnittstellen wurde mit demselben Restriktionsenzym 5'- und 3'-seitig des PCR-Produktes kloniert und die richtige Orientierung des *EGFP*-Gens mittels Sequenzierung geprüft. Für die Klonierung in übliche Hefepasmide wurden die Gene für *EGFP* und *lacZ* Gen jeweils in ein *low*- und ein *high-copy* Hefepasmid kloniert. *Low-copy* Plasmide liegen in einer geringen Kopienzahl (< 20) in der Zelle vor, wohingegen *high-copy* Plasmide in einer Kopienzahl von meist bis zu hundert Kopien in der Zelle vorliegen (Mülhardt, 2003). Die Kopienzahl der Plasmide ist von ihrem Replikationsursprung (*ori*) abhängig. Je höher die Kopienzahl eines Plasmids in der Zelle ist, desto mehr auf dem Plasmid kodiertes Protein wird gebildet.

4.1.4 Generierung plasmidfreier Sumpter Hefen

Alle konstruierten Plasmide wurden in die Sumpter Hefen ohne Plasmid transformiert. Damit die Sumpter Hefen das Plasmid verlieren, wurden sie unter nicht-plasmidselektiven Bedingungen über mehrere Tage kultiviert. Sumpter Hefen ohne Plasmid wurden mittels Überstempeln von nicht-plasmidselektiven auf plasmidselektive Kultivierungsplatten identifiziert. Kolonien die unter plasmidselektiven Bedingungen nicht mehr wachsen konnten haben ihr Plasmid verloren (vgl. Kapitel 3.1.4).

4.1.5 Charakterisierung der genetisch veränderten Sumpter Hefen

Die Antwort der Sumpter Hefen mit den konstruierten Plasmiden auf verschiedene DHT-Konzentrationen wurde über mindestens 60 Stunden gemessen (Kapitel 3.1.5). Die Transformation der Hefen mit den *lacZ*-Plasmiden resultierte nur beim *high-copy* Plasmid in einem DHT-abhängigen Absorptionssignal. Wahrscheinlich liegt das *low-copy* Plasmid p416PGKlacZ in zu geringer Kopienzahl in den Zellen vor, so dass keine ausreichende Menge β -Galactosidase gebildet werden kann. Der Hefestamm mit dem *high-copy* Plasmid p426PGKlacZ zeigt DHT-abhängige Absorptionssignale, allerdings erst nach 58 Stunden Inkubation. Dieser Unterschied zum originalen Sumpter Stamm könnte damit erklärt werden, dass auf dem Sumpter Plasmid mindestens ein Gen für einen Transporter für die Aufnahme von Sterol in die Hefezelle codiert ist, das wahrscheinlich für eine schnellere Steroidaufnahme in die Zelle und damit für eine schnellere Synthese der β -Galactosidase sorgt. Die konstruierten Plasmide haben keine zusätzlichen Gene für Transporter.

Bei allen Hefen mit *lacZ*-Plasmiden wurde bei geringen DHT-Konzentrationen (10^{-11} M bis 10^{-9} M) ab ca. 40 Stunden Inkubation ein geringer Signalanstieg ohne klare Konzentrations-Wirkungsbeziehung festgestellt. Der Grund hierfür ist jedoch unklar. Da mit Hilfe dieses Experiments die tendenziellen Effekte bei der Verwendung von *low-copy* bzw. *high-copy* Plasmiden in Bezug auf die zeitliche Lage und die Höhe der Signalmaxima untersucht werden sollten, wurde diese unklare Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei geringen DHT-Konzentrationen nicht weiter geprüft.

Bei den mit dem Plasmid pSumpterEGFP transformierten Hefen ging das Signal der relativen Fluoreszenz bereits nach 24 Stunden in eine Plateauphase über. Der Test kann somit schon nach 24 Stunden ausgewertet werden. Auch die Hefestämme mit dem *low-copy* Plasmid p416PGKEGFP und dem *high-copy* Plasmid p426PGKEGFP wiesen schon nach 24 Stunden ein Signalmaximum auf. Bemerkenswert sind hier die unterschiedlichen relativen Signalstärken. Der Hefestamm mit dem veränderten Sumpter Plasmid weist ein Maximum bei 1500 relativen Fluoreszenzeinheiten auf. Der Hefestamm mit dem *low-copy* EGFP-Plasmid zeigt bereits eine doppelt so hohe relative Signalstärke mit 3000 relativen Fluoreszenzeinheiten. Die mit dem *high-copy* EGFP-Plasmid transformierten Hefen weisen das höchste relative Fluoreszenzsignal mit maximal 15000 relativen Fluoreszenzeinheiten auf. Diese Unterschiede in der Signalstärke sind wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Kopienzahl der Plasmide in der Hefezelle zurückzuführen. Je mehr Kopienzahlen vorliegen, desto mehr EGFP wird gebildet und umso stärker ist das Signal. Das Sumpter Plasmid ist, wie aus diesen Ergebnissen zu erkennen, sehr wahrscheinlich ein *low-copy* Plasmid. Der

Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven aller drei konstruierten EGFP-Hefestämme zeigt keine großen Unterschiede in deren Verlauf auf. Ab einer DHT-Konzentration von 10^{-8} M wird mit allen Plasmiden ein Signal in den Hefen induziert. Das Signalmaximum liegt bei 10^{-8} bzw. 10^{-7} M DHT und fällt dann ab. Die unterschiedlichen Signalintensitäten scheinen somit kaum einen Effekt auf die Aussagekraft der Hefeassays zu haben. Der Signalabfall bei 10^{-7} bzw. 10^{-6} M DHT ist wahrscheinlich nicht auf eine Toxizität von DHT in diesen Konzentrationen zurückzuführen, denn bei den Hefen mit den *lacZ*-Plasmiden konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Vorstellbar wäre hier, dass bei DHT-Konzentrationen ab 10^{-6} M sehr viel EGFP synthetisiert wird, aber die Fluoreszenz der EGFP-Moleküle stark sinkt. Die Faltung des Fluorophors in EGFP verbraucht Sauerstoff. Ist nicht mehr genügend Sauerstoff im Hefemedium enthalten, wird zwar noch EGFP exprimiert, kann aber nicht mehr korrekt gefaltet werden und die Fluoreszenzintensität geht zurück (Cormack, 1998). Während der Inkubation der 96-well Platten wurde aus technischen Gründen nur mit max. 65 Upm geschüttelt. Bei Hefeflüssigkulturen sind aber Schüttelgeschwindigkeiten von 200 Upm üblich, um genügend Sauerstoff ins Medium einzutragen. Durch das verminderte Schütteln der Hefeplatten könnte es zu dem erwähnten Sauerstoffmangel gekommen sein.

Der wesentliche Vorteil des Austauschs des Reportergens von *lacZ* zu *EGFP* ist die Halbierung der Inkubationszeit bis zum Signalmaximum. Der Test ist nun schon nach 24 Stunden auswertbar.

4.2 Konstruktion und Charakterisierung des BY4741 *S. cerevisiae*

Hefeassays

4.2.1 Klonierung

Es wurde ein vom Sumpter Stamm unabhängiger *S. cerevisiae* Reportergenassay entwickelt (Kapitel 3.2), da der von Sohoni und Sumpter entwickelte Hefeassay von Glaxo Smith Kline vermarktet wird und er dadurch kommerziell bedingte Einschränkungen in der Einsetzbarkeit im nicht wissenschaftlich forschenden Bereich zum Beispiel für die WADA aufweist. Für diesen neuen Reportergenassay wurde ein Expressionsplasmid mit starkem Promoter (GPD-Promoter) und dem Gen für den humanen Androgenrezeptor konstruiert. Die Klonierung des Androgenrezeptors gestaltete sich dabei sehr schwierig, da bei der Amplifikation des Gens sehr wenig spezifisches PCR-Produkt und viele unspezifische Nebenprodukte auftraten. Dies könnte an den im Gen des Androgenrezeptors vorhandenen Trinukleotidwiederholungen (GCA, GGC, GGT) liegen. Durch Zusatz von 8 % DMSO konnte die Ausbeute an

spezifischem PCR-Produkt erhöht werden. Das konstruierte AR-Expressionsplasmid wurde in den Stamm BY4741 transformiert. Dadurch wird der Androgenrezeptor, wie im Sumpter Stamm konstitutiv in den Hefezellen exprimiert. Zusätzlich zum AR-Expressionsplasmid wurde außerdem das EGFP Reporterplasmid p426PGKEGFP in diesen Stamm transformiert. Die Expression des Androgenrezeptors und somit die Funktionalität des Plasmids wurde in Proteinproben der konstruierten Hefen mittels immunologischer Detektion nach SDS-PAGE und Western Blot gezeigt. Obwohl der Androgenrezeptor in der Literatur mit einer Größe von 110 kDa angegeben wird, war die Bande des Androgenrezeptors nach der immunologischen Detektion im Vergleich mit dem Proteinstandard bei einer Größe von ca. 130 kDa auf dem Film zu sehen. Eine beispielhafte Western Blot Analyse von LNCap Zelllysate im Produktdatenblatt des AR-Antikörpers zeigt jedoch ebenfalls ein Laufverhalten des AR oberhalb der Bande von 120 kDa des Proteinmarkers.

Der so konstruierte *S. cerevisiae* Assay wurde in weiteren Versuchen getestet.

4.2.2 Bestimmung der Kultivierungsbedingungen

Der Sumpter Stamm wird in den Hefetest mit einer Zelldichte von ca. 2×10^5 Zellen/ml eingesetzt. Zur Berechnung dieser Zellzahl diente die Annahme, dass einer OD_{690} von 1 eine Zellzahl von *S. cerevisiae* von 2×10^7 Zellen/ml entspricht. Eine Auszählung der Zellzahl einer Hefekultur mit einer OD_{690} von 1 mittels Neubauer Zählkammer hat diese Annahme bestätigt. Für die Bestimmung der Kultivierungsbedingungen des neu konstruierten Assay in *S. cerevisiae* wurden ähnliche Zellzahlen von 10^5 bis 10^6 Zellen/ml getestet. Die unterschiedlichen Zellzahlen wirkten sich vor allem auf den Zeitpunkt des Signalmaximums aus. Als ideale Zellzahl, resultierend aus dem Zeitpunkt und der Stärke des Signalmaximums wurden 5×10^5 Zellen/ml, entsprechend 5×10^4 Zellen/well, in den weiteren Versuchen eingesetzt. Bei diesen Bedingungen zeigt der konstruierte Hefeassay im Vergleich zum original Sumpter Stamm eine wesentlich kürzere Inkubationszeit bis zum Signalmaximum. Dies ist wahrscheinlich hauptsächlich auf die Verwendung von *EGFP* anstelle von *lacZ* als Reportergen zurückzuführen. Wie bereits erwähnt kann EGFP schneller nachgewiesen werden als der Farbumschlag des von der β -Galactosidase umgewandelten Substrats. Nach Erreichen des Signalmaximums sinkt das relative Fluoreszenzsignal bei dem neu konstruierten Assay relativ schnell wieder ab (Abbildung 3.21 B). Dies ist beim relativen Absorptionssignal des Sumpter Stammes nicht der Fall (Abbildung 3.13 A). Das Absinken des relativen Signals beim konstruierten Assay ist auf eine wachsende Zellzahl bei gleich

bleibender Fluoreszenz zurückzuführen (Abbildung 3.22), da das relative Signal aus dem Quotienten von Fluoreszenz und Trübung bestimmt wird. Die Hefezellen vermehren sich noch, allerdings wird kein fluoreszierendes EGFP mehr gebildet. Dies könnte auf einen Sauerstoffmangel im Hefemedium und somit auch in der Hefezelle zurückzuführen sein. Die Fluoreszenzintensität von EGFP geht wie bereits erwähnt unter Sauerstoffmangel zurück, da für die korrekte Faltung des Fluorophors im EGFP Sauerstoff gebraucht wird (Cormack, 1998). Die *S. cerevisiae* Hefezellen können sich aber auch unter limitierten Sauerstoffbedingungen vermehren, da *S. cerevisiae* ein fakultativer anaerober Organismus ist. Die Messvoraussetzungen erlauben kein ausreichendes Schütteln der Platten, so dass nur wenig Sauerstoff ins Medium eingetragen wird. Durch verstärktes Schütteln (200 Upm) könnte eine Sauerstoffsättigung im Hefemedium jedoch erreicht werden, wodurch der Abfall der relativen Fluoreszenz verhindert werden könnte. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

4.3 Konstruktion und Charakterisierung des KO110 *S. pombe* Hefeassays

In humanen Zellen können östrogene und androgene Substanzen sehr leicht in die Zelle gelangen und an ihren intrazellulären Rezeptor binden. Für Hefeassays konnte in der Literatur gezeigt werden, dass für einige Substanzen falsch positive und falsch negative Ergebnisse auftreten können (Kolle et al., 2010). Die artspezifische Zellwand von Hefen, könnte die Aufnahme von bestimmten Substanzen in die Zelle erschweren oder verhindern, so dass ein Nachweis dieser Substanzen in manchen Hefen nicht möglich wäre. Außerdem ist bekannt, dass Hefezellen ABC-Transporter besitzen, die Substanzen, unter anderem auch Steroide aus der Zelle pumpen (Ernst et al., 2005). Der unterschiedliche Metabolismus in humanen und Hefezellen kann auch ein Problem im Hefeassay darstellen. Vorstellbar ist, dass einige Substanzen direkt nach der Aufnahme in die Hefezelle in Metabolite umgewandelt werden, die nicht mehr an den Androgenrezeptor binden oder ihn nicht mehr aktivieren können. In der Literatur ist beschrieben, dass Steroide in Hefezellen eine Stressantwort auslösen können und verschiedene Detoxifikationsmechanismen für Steroidhormone in Hefen existieren (Cresnar und Zakelj-Mavric, 2009; Prasad et al., 2010). Zum einen könnten Substanzen also nicht in die Zelle gelangen, zum anderen könnten sie gezielt wieder ausgeschleust oder in wirkungslose Metabolite umgewandelt werden, so dass ein Nachweis mittels hefebasierten Reporterassays nicht möglich wäre und falsch negative Ergebnisse erzielt würden. Vorstellbar ist außerdem, dass in humanen Zellen wirkungslose Substanzen in Hefen zu

Substanzen mit androgenen oder antiandrogenen Eigenschaften metabolisiert werden. Somit würden falsch positive Ergebnisse auftreten. Um diese im Hefeassay potentiell auftretenden Probleme zu relativieren, sollte eine weitere Hefe in den Nachweistest einbezogen werden. Die zusätzliche Verwendung einer phylogenetisch völlig von *S. cerevisiae* verschiedenen Hefe, wie *S. pombe* (vgl. Kapitel 1.11), sollte durch einen unterschiedlichen Metabolismus und einen anderen Aufbau der Zellwand (vgl. Kapitel 1.11) den Nachweis der Aktivität eines viel größeren Spektrums androgener Substanzen erlauben. Solch ein weit gefächerter Nachweis der Aktivität von Substanzen, unabhängig ihrer chemischen Struktur, würde vor allem in der Dopinganalyse einen großen Vorteil darstellen, denn in diesem Feld müssen viele, sehr unterschiedliche Substanzen, teilweise ohne Wissen ihrer chemischen Struktur nachgewiesen werden.

4.3.1 Klonierung

Der *S. pombe* Assay wurde wie der Assay im BY4741 *S. cerevisiae* Stamm aufgebaut, mit einem Expressionsplasmid für den humanen Androgenrezeptor und einem Reporterplasmid mit *EGFP* (Kapitel 3.3.1). Zur Konstruktion des *S. pombe* Reporterplasmids wurde der *S. cerevisiae* Promoter aus dem Plasmid des Sumpter Stammes (Phosphoglyceratkinase [PGK] Promoter mit drei ARE) verwendet. Für das *S. cerevisiae* Gen der Phosphoglyceratkinase (*PGK1*) gibt es ein homologes Gen in *S. pombe* (Gene ID: 2539764). Die codierenden Sequenzen der PGK Gene in *S. cerevisiae* und *S. pombe* stimmen zu 69 % überein (BLAST Ergebnis mittels <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Allerdings ist die Sequenz des PGK-Promoters in *S. pombe* noch nicht veröffentlicht. Aufgrund der Homologie beider PGK Gene wurde der *S. cerevisiae* PGK Promoter mit den ARE plus *EGFP* in das *S. pombe* Plasmid pJR1-3XU kloniert, mit dem AR-Expressionsplasmid in den Hefestamm KO110 transformiert und die Funktionalität des neuen Assays durch Zugabe verschiedener DHT Konzentrationen getestet (Abbildung 3.26). Dabei konnte eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurve aufgezeigt werden. Der *S. cerevisiae* PGK-Promoter mit drei ARE kann demnach auch in *S. pombe* eine Expression des nachgeschalteten Gens regulieren. Mittels immunologischer Detektion nach SDS-PAGE und Western Blot von Proteinproben dieser konstruierten Hefen konnte außerdem gezeigt werden, dass das Expressionsplasmid für den humanen Androgenrezeptor funktionstüchtig ist und der humane Androgenrezeptor in den Hefezellen exprimiert wird.

4.3.2 Bestimmung der Kultivierungsbedingungen

Wie im vorherigen Assay wurde die optimale Zellzahl von 5×10^4 Zellen/well bestimmt (Kapitel 3.3.2). Der *S. pombe* Assay zeigte genauso wie die anderen konstruierten EGFP-Hefeassays ein Signalmaximum nach ca. 24 Stunden Inkubation. Danach fiel jedoch die Signalstärke wieder sehr stark ab. Auffällig ist dabei, dass das Fluoreszenzsignal schnell sinkt, sobald die Hefen das exponentielle Wachstumsstadium verlassen. Das Ende des exponentiellen Wachstums wird wahrscheinlich durch den Mangel an Nährstoffen im verbrauchten Medium hervorgerufen. Der Abfall der Trübung (OD_{690}) nach ca. 35 Stunden Inkubation lässt sogar auf ein Absterben der Zellen und darauf folgende Zelllyse schließen. Dadurch gelangen EGFP und Proteasen ins Hefemedium, was einen Abbau von EGFP zur Folge hat. Durch den schnellen Signalabfall der relativen Fluoreszenz bleibt für die optimale Messung ein relativ kleines Zeitfenster von ca. 10 Stunden (Inkubationszeit 18 bis 28 Stunden). Selbst wenn sich dieses Zeitfenster um bis zu vier Stunden verschiebt, sollten bei einer Messung nach 24 Stunden Inkubation auswertbare Ergebnisse erzielt werden. Wie stabil dieses Zeitfenster allerdings genau ist wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Beim Sumpter Assay mit EGFP geht die Signalstärke bei einer Inkubation von über 24 Stunden auch zurück, bleibt aber bis zu 60 Stunden in einem gut messbaren Bereich. In beiden konstruierten Assays werden gleiche Zellzahlen in gleichem Volumen Zellkulturmedium eingesetzt. Im konstruierten *S. cerevisiae* Assay geht aber die Zellzahl im Vergleich zum konstruierten *S. pombe* Assay nicht zurück. Mögliche Gründe könnten sein, dass *S. pombe* größere Ansprüche an das Medium stellt (Nährstoffe und Sauerstoff) oder dass das *S. pombe* Minimalmedium weniger Nährstoffe beinhaltet als das *S. cerevisiae* Minimalmedium und deshalb schneller aufgebraucht wird. Im *S. cerevisiae* Minimalmedium sind zum Beispiel 2 % Glucose enthalten, wohingegen im *S. pombe* Minimalmedium nur 1 % Glucose enthalten ist. Andere *S. pombe* Minimalmedien verwenden 2 % Glucose. Ein verstärktes Schütteln des *S. pombe* Assays während der Inkubation und ein größerer Glucosegehalt des *S. pombe* Minimalmediums könnten vielleicht das Absterben der Hefezellen verzögern (Klement et al., 2011). Die wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

4.4 Vergleich der konstruierten Hefeassays

Um die Eignung der konstruierten Hefeassays für die Doping-*Prescreening* Analyse und mögliche Unterschiede beider Assays im Nachweis androgener und antiandrogener Eigenschaften von Substanzen zu untersuchen, wurden DHT, Dopingsubstanzen, Antiandrogene, zwei Naringeninderivate, zwei SARMs und zwei Ausscheidungsversuche in den Assays analysiert.

4.4.1 DHT in den konstruierten Hefeassays

Zuerst wurden die nicht normierten relativen Fluoreszenzwerte von DHT in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-5} M verglichen (Kapitel 3.4.1). Dabei wurde festgestellt, dass das erreichte Signalmaximum im *S. cerevisiae* Assay höher war als im *S. pombe* Assay, welcher jedoch ein viel geringeres Signalminimum aufwies. Das Verhältnis von Signalmaximum zu Hintergrund war dadurch beim *S. pombe* Assay ungefähr doppelt so hoch als beim *S. cerevisiae* Assay. Die Differenzen zwischen Signalmaximum und -minimum lagen mit ca. 10000 Fluoreszenzeinheiten im *S. cerevisiae* Assay und ca. 7000 Fluoreszenzeinheiten im *S. pombe* Assay allerdings in einem ähnlichen Bereich.

4.4.2 Dopingsubstanzen in den konstruierten Hefeassays

In einem weiteren Versuch wurden mehrere Dopingsubstanzen in beiden konstruierten Hefeassays eingesetzt (Kapitel 3.4.2). Für alle getesteten Substanzen konnte eine Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt werden. Dabei schien der *S. pombe* Assay eine leicht geringere Sensitivität als der *S. cerevisiae* Assay zu besitzen, da die halbmaximalen effektiven Konzentration (EC50) aller Substanzen im *S. cerevisiae* Assay geringer als im *S. pombe* Assay waren. Allerdings konnten einige Werte nicht bestimmt werden, oder wurden aus nicht-sigmoidalen Konzentrations-Wirkungskurven berechnet. Diese Werte sind in den entsprechenden Tabellen mit Ausrufezeichen versehen und sollten mit Vorsicht in die Betrachtungen eingehen. Dies ist vor allem beim *S. pombe* Assay der Fall, da dort die meisten Konzentrations-Wirkungskurven nicht die Plateau-Phase erreicht haben. Höhere Substanzkonzentrationen waren aber wegen erschwerter Löslichkeitsbedingungen oder der Toxizität für die Hefe nicht in die Assays einsetzbar. Außerdem zeigte eine von sieben Substanzen (Stanozolol) im *S. cerevisiae* Assay bereits ab einer Konzentration von 10^{-8} M einen Effekt, im *S. pombe* Assay hingegen erst ab einer Konzentration von 10^{-7} M.

Zusammenfassend zeigten die beiden neuen Hefeassays bei den untersuchten Substanzen geringe Unterschiede in Sensitivität, relativer Signalstärke und Nachweisbereich von Substanzen bei gleichzeitig sehr ähnlichen Bedingungen in der Versuchsdurchführung mit Kultivierungsbedingungen, Zellzahlen, Kulturvolumina und Inkubationszeit. Dadurch ist eine Kombination der beiden Hefeassays leicht möglich, was sich positiv auf das Nachweisspektrum von Substanzen auswirken könnte. Die bereits besprochenen Probleme von Hefeassays, wie die verhinderte Aufnahme von Substanzen, das Ausschleusen von Substanzen oder der zu humanen Zellen unterschiedliche Metabolismus von Substanzen könnte durch die Kombination dieser beiden phylogenetisch sehr verschiedenen Hefen relativiert werden. Substanzen, die die Zellwand der einen Hefe nicht durchdringen können, könnten vielleicht durch die Zellwand der anderen Hefe gelangen. Auch ist denkbar, dass einige Substanzen, von der einen Hefe aus der Zelle ausgeschleust werden, von der anderen Hefe aber nicht oder dass eine Substanz in der einen Hefe in einen wirkungslosen Metaboliten umgewandelt wird aber in der anderen Hefe nicht. Durch die Kombination beider Assays könnten falsch negative Ergebnisse somit reduziert werden.

Der Vergleich des Sumpter Hefeassays mit dem neu konstruierten *S. cerevisiae* Assay zeigt, dass die Hälfte der Substanzen (Boldenon, Metandienon, Nandrolon, Stanozolol) einen geringeren EC50 Wert im neu konstruierten Assay, als im Sumpter Assay aufwiesen. Die Sensitivität des neu konstruierten Assays ist demnach höher als die des Sumpter Assays. Die anderen Substanzen wurden mit ähnlichen EC50 Werten detektiert, darunter auch DHT ($5,2 \times 10^{-9}$ M im konstruierten Hefeassay und $6,81 \times 10^{-9}$ M im Sumpter Hefeassay).

Der konstruierte *S. pombe* Assay wies größten Teils höhere EC50 Werte als der Sumpter Assay auf. Allerdings wurden beim *S. pombe* Assay die Plateaus der Konzentrations-Wirkungskurven nicht erreicht. Je nachdem wo das tatsächliche Plateau liegt, können die EC50 Werte in dem berechneten Bereich liegen oder größer sein. Der *S. pombe* Assay hat bei den getesteten Substanzen damit auf jeden Fall höhere EC50 Werte als die beiden *S. cerevisiae* Assays und demzufolge eine geringere Sensitivität gegenüber den getesteten Substanzen, darunter auch DHT mit einem EC50 Wert von $3,27 \times 10^{-8}$ M.

Andere in der Literatur beschriebene Hefeassays weisen ähnliche EC50 Werte für DHT wie der Sumpter Assay oder der neu konstruierte *S. cerevisiae* Assay mit Werten von $3,5 \times 10^{-9}$ M (Gaido et al., 1997) oder $5,5 \times 10^{-9}$ M (Leskinen et al., 2005) auf. Allerdings existieren auch verschiedene Hefeassays mit einem EC50 Wert für DHT die mit Werten von $1,6 \times 10^{-8}$ M (Beck et al., 2008), $1,3 \times 10^{-8}$ M (Li et al., 2008) und $3,3 \times 10^{-8}$ M (Bovee et al., 2007) im Bereich des EC50 Wertes vom konstruierten *S. pombe* Assay liegen. Dabei weisen alle

genannten Hefeassays, außer dem Assay von Leskinen et al., erstmals ab einer DHT-Konzentration von 10^{-8} M einen deutlichen Signalanstieg auf. Dies ist auch beim Sumpter Assay und den beiden in dieser Arbeit konstruierten Hefeassays der Fall. Der Hefeassay von Leskinen et al. zeigte schon bei einer DHT-Konzentration von 10^{-9} M einen starken Signalanstieg und hat damit eine geringere Nachweisgrenze für DHT als alle anderen genannten Hefeassays.

4.4.3 DHT in Sammelurin in den konstruierten Hefeassays

Für die Durchführung von *Prescreening* Tests bei Dopinganalysen wäre es von Vorteil unbehandelte Urinproben direkt in die Hefeassays einsetzen zu können. Im folgenden Versuch wurde getestet, zu welchen Anteilen Urinproben folgender Ausscheidungsversuche in die Hefeassays eingesetzt werden sollten, um ein optimales Signal zu erreichen. Dafür wurde mit DHT in verschiedenen Konzentrationen versetzter Sammelurin in beiden konstruierten Hefeassays mit je 10 bzw. 20 %igem Anteil am Hefemedium getestet (Kapitel 3.4.3). Der konstruierte *S. cerevisiae* Assay zeigte auch nach Zugabe von 20 % Urin noch eine gute sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurve mit DHT. Allerdings ist das Signalmaximum bei der Zugabe von nur 10 % Urin bei gleichem Signalminimum im Vergleich zur Zugabe von 20 % Urin höher, obwohl durch die Zugabe von 20 % Urin die doppelte DHT-Konzentration im Hefemedium vorliegt. Die Verdünnung des Mediums mit Urin oder auch Urinkomponenten scheinen sich negativ auf das Signalmaximum im konstruierten *S. cerevisiae* Assay auszuwirken. Bei diesem Assay scheint deshalb die Zugabe von 10 % Urin zu einem stärkeren Signal zu führen. Im *S. pombe* Assay ist die Signalstärke bei der Zugabe von 10 %, als auch von 20 % Urin im Vergleich zur DHT-Zugabe ohne Urin wesentlich geringer. Es ist zwar noch eine Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeit zu verzeichnen, allerdings nicht annähernd ein sigmoidaler Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve. *S. pombe* scheint, wie bereits in Kapitel 4.3 erwähnt, anspruchsvoller in Bezug auf das Kultivierungsmedium zu sein als *S. cerevisiae*.

4.4.4 Trenbolox-Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays

Um den möglichen Einsatz beider konstruierten Hefeassays im Doping-*Prescreening* weiter zu prüfen, wurde der in den Sumpter Hefen durchgeführte Trenbolox-Ausscheidungsversuch ebenfalls in diesen Assays durch Zugabe von 10 % Urin dieses Ausscheidungsversuchs ins Medium untersucht (Kapitel 3.4.4). Im *S. pombe* Assay zeigten alle Urinproben im Zeitraum von 03:40 bis 21:20 h nach Einnahme von Trenbolox ein höheres Fluoreszenzsignal als die Referenzprobe zum unmittelbaren Zeitpunkt (0 h) der Einnahme. Im *S. cerevisiae* Assay konnten nur vier von fünf Proben nach Substanzeinnahme als positiv detektiert werden. Auch zeigte dieser Assay bei zwei Proben nur eine leichte Erhöhung des Signals im Vergleich zur Referenzprobe. Beim Sumpter Assay zeigten alle fünf Urinproben nach Substanzeinnahme ein höheres Signal als die Referenzprobe.

Die Urinprobe vor Substanzeinnahme zeigte in beiden Hefeassays ein viel geringes relatives Fluoreszenzsignal als bei der Zugabe von 10 % Sammelurin ins Hefemedium, weshalb die Urinproben nach Substanzeinnahme auf diese interne Referenzprobe bezogen wurden. Die niedrigen Werte der Urinprobe vor Substanzeinnahme im Vergleich zum Sammelurin könnten auf eine individuelle unter dem Durchschnitt liegende Konzentration an androgen wirksamen Substanzen im normalen Urin zurückzuführen sein.

Wie bereits im Ausscheidungsversuch beim Sumpter Assay diskutiert (Kapitel 4.1) konnten in den Urinproben 3:40 und 10:45 Stunden nach Substanzeinnahme Norandrosteron in Konzentrationen oberhalb des WADA Grenzwertes mittels Massenspektrometrie detektiert werden (Parr et al., 2008). In den beiden konstruierten Hefeassays zeigten diese Proben jedoch nicht so ein starkes Signal wie die Urinproben bei 19:10 Stunden nach Substanzeinnahme. Eine mögliche Erklärung wäre, dass mit den Hefeassays Norandrosteron nicht so gut nachgewiesen werden kann, wie ein oder mehrere Metabolite in der 19:10 Stunden Urinprobe. In der Literatur ist beschrieben, dass der Hauptmetabolit von Estra-4,9-dien-3,17-dion, 17 β -Hydroxyestra-4,9-dien-3-on in allen Urinproben nach Substanzeinnahme nachgewiesen werden konnte (Parr et al., 2008).

Bei der Urinabgabe wurden Urinmenge und Sammelzeitraum, also die Differenz zwischen zwei Urinabgaben dokumentiert (Daten nicht gezeigt). Es konnte keine Abhängigkeit der Signalstärke in den Hefeassays zu den Daten der Urinvolumen oder des Sammelzeitraumes festgestellt werden. Allerdings fehlt die Angabe der Urinmenge und des Sammelzeitraums für die Referenzprobe. Durch diese fehlenden Daten, wurden die Urinmenge und der Sammelzeitraum nicht in der Auswertung der relativen Fluoreszenzwerte berücksichtigt, da sonst ein Vergleich mit der Referenzprobe nicht mehr möglich gewesen wäre.

In diesem Ausscheidungsversuch scheint der konstruierte *S. pombe* Assay besser zum Nachweis der eingenommenen Substanz bzw. deren Metabolite geeignet zu sein als der konstruierte *S. cerevisiae* Assay. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Substanz und deren Metabolite besser von der *S. pombe*, als von *S. cerevisiae* Zelle aufgenommen werden. Außerdem könnte eine unterschiedliche Metabolisierung der Substanz oder der Metabolite in den beiden Hefen zu diesen Unterschieden im Nachweis führen.

Im Vergleich zum Sumpter Assay konnte Estra-4,9-dien-3,17-dion und seine Metabolite in Urinproben mit den konstruierten Assays schlechter nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.1.1.4). Beim Sumpter Assay lag die Referenzprobe mit einem Wert von 0,2 deutlich unter den Werten der Urinproben nach Substanzeinnahme (Werte von 0,6 bis 1,3). Bei den konstruierten Hefeassays lag die Referenzprobe bei 0,5 für den *S. pombe* und bei 0,55 für den *S. cerevisiae* Assay. Die Werte von den Urinproben nach Substanzeinnahme reichen von 0,6 bis 0,85 beim *S. pombe* und von 0,55 bis 0,9 beim *S. cerevisiae* Assay. Diese Unterschiede könnten an zusätzlichen Genen für die Substanzaufnahme auf dem Sumpter Plasmid liegen. Auch ein unterschiedliches Verhältnis von Androgenrezeptormolekülen zu Promoterelementen ist möglich. Im Sumpter Assay ist das Gen für den humanen Androgenrezeptor im Genom der Hefe integriert. Bei den beiden anderen Assays liegt dieses Gen auf einem Plasmid vor. Auch besitzen die verwendeten Reporterplasmide unterschiedliche Replikationsursprünge und liegen somit in unterschiedlicher Kopienzahl in den verschiedenen Hefeassays vor. Deshalb ist davon auszugehen, dass in allen drei Assays das Verhältnis von AR-Anzahl zu Promoterelementen unterschiedlich ist.

4.4.5 Methyltestosteron -Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays

In beiden konstruierten Hefeassays wurde außerdem der bereits im Sumpter Assay untersuchte Methyltestosteron-Ausscheidungsversuch analysiert (Kapitel 3.4.5). Dabei konnten mit dem konstruierten *S. cerevisiae* Assay 25 der 46 Urinproben, mit dem *S. pombe* Assay allerdings nur sechs der 46 Proben als positiv getestet werden. Beachtlich war dabei, dass drei der sechs positiven Proben im *S. pombe* Assay mit dem konstruierten *S. cerevisiae* Assay nicht detektiert wurden. Mit beiden konstruierten Assays in *S. cerevisiae* und *S. pombe* scheinen demnach unterschiedliche Metabolite von Methyltestosteron mit unterschiedlicher Sensitivität nachgewiesen zu werden. Für den *S. pombe* Assay konnte somit gezeigt werden, dass Methyltestosteron und seine Metabolite dieses Reportersystem nur sehr schlecht induzieren. Die Unterschiede der beiden Hefen in der Nachweissensitivität für verschiedene Substanzen können auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein, die bereits für das

Experiment mit den Doping-Reinsubstanzen und den Trenbolox-Ausscheidungsversuch diskutiert wurden. Im Vergleich zum Sumpter Assay lagen bei beiden neu konstruierten Hefeassays weniger Urinproben nach Substanzeinnahme über dem Referenzwert. Im Sumpter Assay wurden nur 11 der 46 Urinproben nicht als positiv detektiert. Die Unterschiede im Nachweis von Substanzen beider *S. cerevisiae* Assays könnten, wie bereits für den Trenbolox-Ausscheidungsversuch diskutiert, auf ein unterschiedliches AR-Promoter-Verhältnis oder auch auf eine verbesserte Substanzaufnahme durch die Sumpter Hefen zurückzuführen sein.

4.4.6 1-Androsteron -Ausscheidungsversuch in den konstruierten Hefeassays

In beiden konstruierten Hefeassays wurde ein dritter Ausscheidungsversuch, in diesem Fall mit der Substanz 1-Androsteron, getestet (Kapitel 3.4.6). Dabei zeigten beide Hefeassays erhöhte Fluoreszenzsignale in den Urinproben von 3 bis 31 Stunden nach Substanzeinnahme im Vergleich zur Referenzprobe vor Substanzeinnahme. Dabei konnten allerdings mit dem *S. pombe* Assay die Urinproben 18 und 30 Stunden nach Substanzaufnahme nicht nachgewiesen werden. Auch in diesem Ausscheidungsversuch zeigte die Urinprobe vor Substanzeinnahme ein viel geringeres Fluoreszenzsignal als 10 % Sammelurin im Hefemedium. Bei dem Trenbolox- und dem 1-Androsteron-Ausscheidungsversuch handelte es sich um die gleiche Versuchsperson. Es könnte sich deshalb, wie bereits erwähnt, um eine individuell bedingte niedrige Konzentration an endogenen Substanzen im Urin handeln. Für die eingenommene Substanz 1-Androsteron (3β -Hydroxy- 5α -androst-1-en-17-on) konnten die Metabolite 1-Testosteron (17β -Hydroxy- 5α -androst-1-en-3-on), 1-Androstenedion (5α -Androst-1-en-3,17-dion), 3α -Hydroxy- 5α -androst-1-en-17-on, 5α -Androst-1-en- $3\alpha,17\beta$ -diol und 5α -Androst-1-en- $3\beta,17\beta$ -diol neben der Ausgangssubstanz mittels MS Methoden im Urin identifiziert werden (Parr et al., 2011). Dabei konnte die Ausgangssubstanz bis zwei Tage (48 h), 1-Testosteron bis sechs Tage (144 h), 1-Androstenedion bis acht Tage (192 h), 3α -Hydroxy- 5α -androst-1-en-17-on bis sieben Tage (168 h), 5α -Androst-1-en- $3\alpha,17\beta$ -diol bis vier Tage (96 h) und 5α -Androst-1-en- $3\beta,17\beta$ -diol bis drei Tage (72 h) im Urin nachgewiesen werden. Ein erster Nachweis der Ausgangssubstanz und der aufgeführten Metabolite erfolgte dabei bereits nach 0,5 Stunden. Bei den jeweiligen Ausscheidungskinetiken ist jedoch auffällig, dass die Metaboliten bei ca. zehn Stunden nach Substanzeinnahme ein Ausscheidungsmaximum erreichen. Die Konzentration der Metaboliten im Urin sinkt anschließend bis maximal ca. 48 Stunden stark ab. Nur sehr geringe Substanzkonzentrationen

können bis zu acht Tage (192 h) durch MS Analytik nachgewiesen werden. Absolute Konzentrationen der Metabolite wurden mittels GC-MS nicht bestimmt, da keine Referenzsubstanzen vorhanden waren. Im Zeitraum des Ausscheidungsmaximums bis ca. zwei Tage nach Substanzeinnahme zeigten beide Hefeassays die Urinproben als positiv an. Urinproben unter drei Stunden nach Substanzeinnahme konnten nicht und Urinproben über 31 Stunden nach Substanzeinnahme nur vereinzelt als positiv detektiert werden. Unter drei Stunden nach Substanzeinnahme ist die Konzentration der Nachweissubstanzen im Urin wahrscheinlich noch zu gering. Es wäre jedoch interessant eine feinere Abstufung der Urinabgabe unter drei Stunden zu untersuchen, um einen genaueren Zeitpunkt für den erstmöglichen Nachweis von positiven Urinproben zu ermitteln. Bei Urinproben von 46 bis 101 Stunden nach Substanzeinnahme konnten mit dem *S. cerevisiae* Assay sieben von 18 Proben detektiert werden, mit dem *S. pombe* Assay allerdings nur eine von 18. Hingegen konnten mittels *S. pombe* Assay im Zeitfenster von 105 bis 233 Stunden nach Substanzeinnahme neun von 25 und im *S. cerevisiae* Assay keine von 25 Proben als positiv angezeigt werden. Die beiden konstruierten Hefeassays weisen somit sehr unterschiedliche Ergebnisse für Urinproben von 46 bis 233 Stunden nach Substanzeinnahme auf. Wahrscheinlich werden in den nachgewiesenen Urinproben ab 46 Stunden nach Substanzeinnahme unbekannte Metabolite ausgeschieden, deren Aktivität mit unterschiedlicher Sensitivität in den beiden Hefeassays nachgewiesen werden kann. Dies könnte an einer unterschiedlichen Substanzaufnahme in die Hefezelle, einem unterschiedlichen Metabolismus der aufgenommenen Substanzen oder auch an der Ausschleusung von Substanzen aus der Hefezelle liegen. Auch ein unterschiedlicher Besatz an Transkriptionsfaktoren in den unterschiedlichen Hefen wäre denkbar (Drobna et al., 2008). Obwohl der *S. pombe* Assay die Reinsubstanz in Sammelurin nur schlecht erkennt, werden wahrscheinlich die Metabolite relativ gut in den Urinproben angezeigt. Durch die MS Analyse konnte der Metabolit 1-Androstendion bis acht Tage (192 h) nachgewiesen werden. Beide Hefeassays konnten darüber hinaus jeweils eine Urinprobe als positiv identifizieren (282 und 233 Stunden nach Substanzeinnahme).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei niedrigen Konzentrationen von Nachweissubstanzen oder spät mit dem Urin ausgeschiedene Metaboliten von 1-Androsteron, die möglicherweise mittels MS Methoden nicht identifiziert werden konnten, beide Hefeassays sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Eine Kombination beider Assays weist demnach einen beachtlichen Vorteil, in Bezug auf die Nachweisbarkeit der eingenommene

Dopingsubstanz 1-Androsteron in Urinproben zu späteren Ausscheidungszeitpunkten oder niedrigen Konzentrationen, auf.

4.4.7 Antiandrogene und Naringenine in den konstruierten Hefeassays

Um weitere Anwendungsgebiete neben der Dopinganalytik zu prüfen, wurden in weiteren Versuchen drei Antiandrogenen und zwei Naringeninderivate in beiden Hefeassays getestet (Kapitel 3.4.7). Im *S. pombe* Assay konnten dabei keine androgenen Effekte der fünf untersuchten Substanzen nachgewiesen werden, vier der fünf Substanzen (die Naringeninderivate 8-PN und 6-DMAN, Flutamid und Nilutamid) zeigten allerdings antiandrogene Effekte. Eine der Substanzen, 6-DMAN, konnte in *S. pombe* den DHT-Effekt sogar vollständig antagonisieren. Im *S. cerevisiae* Assay zeigten die fünf Substanzen keine (8-PN, Bicalutamid) oder nur sehr schwache (Flutamid, Nilutamid, 6-DMAN) antiandrogene Wirkungen. Für 6-DMAN in einer Konzentration von 10^{-5} M konnte im *S. cerevisiae* Assay zusätzlich ein androgener Effekt gezeigt werden. 6-DMAN zeigte in diesem Experiment androgene und antiandrogene Eigenschaften, sowohl in einer Hefe (*S. cerevisiae*) als auch in der Kombination der beiden Hefeassays. Ein mit nur einem Hefeassay festgestellter androgener und antiandrogener Effekt einer Substanz ließe sich wie folgt erklären. Die Reinsubstanz, wenn sie allein in der Zelle vorliegt, bindet an den Rezeptor und es bilden sich Homodimere, die die Expression des Reportergens aktivieren. Liegt jedoch zusätzlich DHT in der Zelle vor, konkurrieren die beiden Substanzen um die Bindung an den Rezeptor. Dadurch sind einige Rezeptoren mit DHT besetzt und einige mit der anderen Substanz. Bilden sich jetzt AR-Dimere, die DHT und die Substanz gebunden haben, ist eine Aktivierung der Reportergenexpression möglicherweise nicht mehr möglich (Kemppainen und Wilson, 1996). Für den Progesteronrezeptor konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Rezeptordimere, aus einem Rezeptor beladen mit Progestin und einem Rezeptor beladen mit Antiprogestin nur schwach an die DNA binden und somit eine antagonistische Wirkung entsteht (Edwards et al., 1995). Eine androgene und antiandrogene Wirkung einer Substanz in zwei verschiedenen Hefeassays ließe sich folgendermaßen erklären. In beiden Hefeassays sind der Androgenrezeptor und der Promoter auf dem Reporterplasmid gleich. Unterschiede gibt es allerdings bei den in der *S. cerevisiae* bzw. *S. pombe* Zelle vorliegenden Transkriptionsfaktoren (Drobna et al., 2008). Die Unterschiede der 6-DMAN Wirkung in beiden Hefeassays könnte somit auf eine unterschiedliche Ausstattung an Transkriptionsfaktoren in beiden Hefen zurückzuführen sein. Die unterschiedlichen Effekte von 6-DMAN könnten allerdings auch auf eine unterschiedliche Metabolisierung von

6-DMAN in *S. cerevisiae* und *S. pombe* hindeuten. Im Sumpter Assay konnte für 6-DMAN weder eine androgene noch eine antiandrogene Wirkung gezeigt werden. Dies lag daran, dass im Sumpter Assay bereits ab einer Konzentration von 10^{-5} M das Hefewachstum durch die toxischen Effekte von 6-DMAN so stark eingeschränkt war, dass eine Auswertung höherer Konzentrationen nicht möglich war. Die größeren toxischen Effekte von 6-DMAN im Sumpter Assay könnten an einer besseren Aufnahme der Substanz in die Zelle liegen. Wie bereits erwähnt besitzt das Sumpter Plasmid mindestens ein Gen, welches für ein Transportprotein codiert.

In beiden konstruierten Hefeassays konnten die Effekte von DHT im antiandrogenen Test durch alle getesteten Antiandrogene nicht vollständig antagonisiert werden. Es war deshalb nicht möglich die EC₅₀ Werte zu berechnen und mit dem Sumpter Assay zu vergleichen. Die antiandrogenen Eigenschaften der untersuchten Antiandrogene konnten jedoch offensichtlich besser mit dem Sumpter Assay detektiert werden, als mit den konstruierten Assays. Die Antiandrogene Flutamid und Nilutamid konnten im Sumpter Assay den Effekt von 10^{-8} M DHT vollständig antagonisieren. Dies war in den beiden neu konstruierten Assays nicht der Fall.

Um antiandrogene Eigenschaften dieser Substanzen zu detektieren wurde die DHT-Konzentration des halbmaximalen Effekts eingesetzt. Dies entsprach für den *S. cerevisiae* Assay 10^{-8} M und für den *S. pombe* Assay 5×10^{-8} M DHT. Für einen besseren Nachweis antiandrogener Eigenschaften von Substanzen mit diesen Hefeassays könnte der Zusatz einer geringeren DHT-Konzentration oder auch eines schwächeren Agonisten, wie Testosteron getestet werden (vgl. Kapitel 4.1). Dadurch wäre womöglich eine vollständige Antagonisierung der DHT-Wirkung durch die getesteten Substanzen, bei denen nur ein geringer antiandrogener Effekt nachgewiesen wurde, möglich.

4.4.8 SARMs in den konstruierten Hefeassays

Von den zwei in den beiden konstruierten Hefeassays getesteten SARMs zeigte das SARM 4-F einen deutlichen antiandrogenen Effekt (Kapitel 3.4.8). Im Sumpter Assay hingegen konnte nur ein geringer antiandrogener Effekt dieser Substanz nachgewiesen werden. Das SARM S4 zeigte in keinem der drei Hefeassays einen antiandrogenen Effekt. Auch androgene Effekte konnten für beide SARMs mit keinem der drei Hefeassays nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise zeigten weder Bicalutamid, als Ausgangssubstanz dieser beiden SARMs, noch das SARM S4 antiandrogene Wirkungen in den konstruierten Hefeassays, obwohl alle drei Strukturen sehr ähnlich sind. Im Sumpter Assay konnte allerdings die antiandrogene

Wirkung von Bicalutamid gezeigt werden. Bicalutamid konnte aber auch mit dem *S. cerevisiae* Hefeassay von Bovee et al. nicht nachgewiesen, wohingegen die antiandrogenen Eigenschaften des SARM S4 und des SARM 4-F dort gezeigt werden konnten (Bovee et al., 2010). Als Agonist wurde von Bovee et al. jedoch Testosteron in den antiandrogenen Test eingesetzt. Dies hat, wie bereits in Kapitel 4.1 diskutiert, einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Antiandrogenen.

Die verschiedenen Ergebnisse für Bicalutamid im Sumpter Assay im Vergleich zum konstruierten *S. cerevisiae* Assay oder dem *S. cerevisiae* Assay von Bovee et al. könnten, wie bereits erwähnt, auf ein unterschiedliches Verhältnis von AR zum Reportergenpromoter in den unterschiedlichen Assays zurückzuführen sein. Das Verhältnis von Rezeptormolekülen und Reporterplasmiden in der Hefezelle scheint, verbunden mit der Androgenität der zu antagonisierenden Substanz, einen wesentlichen Einfluss auf den Nachweis von antiandrogenen Eigenschaften von Substanzen in Hefeassays zu haben. Deshalb weisen selbst verschiedene Assays in *S. cerevisiae* sehr unterschiedliche Ergebnisse auf. Wie bereits erwähnt müssten noch weitere SARMs in den Hefeassays getestet werden, um eine mögliche Einsetzbarkeit dieser Hefeassays zum Nachweis von SARMs zu zeigen.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Anabole androgene Substanzen werden im Leistungssport laut der WADA Statistik am häufigsten zum Doping missbraucht. Dabei werden diese Substanzen vor allem im Training eingesetzt, vor Wettkämpfen jedoch abgesetzt um positive Wettkampfkontrollen zu vermeiden. Aber auch im Freizeitsport, vor allem beim Bodybuilding, konnte der weitläufige Missbrauch dieser Substanzen nachgewiesen werden. Die Einnahme anaboler androgener Substanzen stellt jedoch aufgrund ihrer weit reichenden Nebenwirkungen ein großes gesundheitliches Risiko dar. Der einzige rechtlich relevante Nachweis dieser Stoffe mittels klassischer Methoden, wie Gaschromatographie gefolgt von Massenspektrometrie, ist zeit- und kostenintensiv. Deshalb ist der Einsatz dieser Methoden auf eine relativ geringe Zahl an Dopingkontrollen beschränkt. Durch die Nutzung eines preiswerten und schnellen *Prescreening* Tests, zum Beispiel durch einen oder die Kombination der konstruierten und hier vorgestellten Hefeassays, könnte die Anzahl der Dopingtests, vor allem in Trainingskontrollen, wesentlich erhöht und somit der Missbrauch anaboler androgener Substanzen im Leistungssport stärker eingeschränkt werden.

In dieser Arbeit wurden zwei neue Reporterergenassays konstruiert, zum einen in der Hefe *S. cerevisiae* und zum anderen in der phylogenetisch von *S. cerevisiae* weit entfernten Hefe *S. pombe*. Beide konstruierten Hefeassays, wie auch ein bereits etablierter Hefeassay von Sohoni und Sumpter (1998) wurden hinsichtlich ihrer Eignung für die Doping-*Prescreening* Analyse getestet und verglichen. Hierfür wurden die Effekte von Dopingsubstanzen und zwei bzw. drei Ausscheidungsversuche in allen drei Assays untersucht. Die drei Hefeassays waren dabei in der Lage Aktivitäten sowohl von Dopingsubstanzen als Reinsubstanzen, als auch von Dopingsubstanzen und deren Metabolite in Urinproben der Ausscheidungsversuche anzuzeigen. Dabei wurde eine unterschiedliche Sensitivität der beiden konstruierten Hefeassays im Nachweis von einigen Substanzen, vor allem bei den Ausscheidungsversuchen, festgestellt. Eine daraus resultierende Kombination beider konstruierter Assays scheint den Nachweis eines weiteren Spektrums von Substanzen zu gewährleisten, als mit einem dieser Assay allein.

Weitere denkbare Anwendungsgebiete der konstruierten Hefeassays könnten der Nachweis von Antiandrogenen und von androgenen oder antiandrogenen Eigenschaften von SARMs sein. Deshalb wurden exemplarisch für diese Substanzklassen drei Antiandrogene, zwei Naringeninderivate und zwei SARMs in den konstruierten Hefeassays getestet und untereinander und mit dem Sumpter Hefeassay verglichen. Die Antiandrogene konnten im

Sumpter Assay den DHT Effekt vollständig antagonisieren. In den konstruierten Hefeassays wiesen nur zwei der drei Antiandrogene (Flutamid, Nilutamid) einen schwachen antiandrogenen Effekt auf. Die Naringeninderivate zeigten im Sumpter Assay keinen (6-DMAN) oder nur einen schwachen Effekt (8-PN). Im konstruierten *S. pombe* Assay konnte allerdings eine starke antiandrogene Wirkung von 6-DMAN nachgewiesen werden. Im konstruierten *S. cerevisiae* Assay wurde hingegen sowohl ein androgener als auch ein antiandrogener Effekt für diese Substanz gezeigt. Für eines der beiden SARMs (SARM 4-F) konnte in allen drei Assays ein antiandrogener Effekt gezeigt werden, allerdings im Sumpter Assay nur ein sehr schwacher. Das andere SARM zeigte in den drei Assays keine Wirkung. Zusammenfassend kann für alle drei untersuchten Hefeassays festgehalten werden, dass sie unterschiedliche Sensitivitäten für verschiedene Substanzen aufweisen. Androgene Eigenschaften konnten teilweise besser mit dem neu konstruierten *S. cerevisiae* Assay nachgewiesen werden als mit dem Sumpter oder dem *S. pombe* Assay, wohingegen antiandrogene Subanzeigenschaften besser mit dem Sumpter Assay als mit den beiden konstruierten Assays nachzuweisen waren. Allerdings konnte auch für eine Substanz (6-DMAN) ein größerer antiandrogener Effekt im konstruierten *S. pombe* Assay als im Sumpter oder im neu konstruierten *S. cerevisiae* Assay detektiert werden. Denkbar wäre, dass die abweichenden Ergebnisse der getesteten Substanzen in den verschiedenen Hefeassays auf Unterschiede in der Substanzaufnahme in die Zellen, im Ausschleusen von Substanzen aus der Zelle, im Metabolismus, in der Ausstattung mit Transkriptionsfaktoren oder im Verhältnis von Androgenrezeptoren zu Promoterelementen begründet sind.

Bedeutende Vorteile der neu entwickelten Hefeassays sind die kurze Inkubationszeit von nur einem Tag und durch die Kombination beider Assays, ein weites Nachweisspektrum von Substanzen. Die Kombination beider neu entwickelten Hefeassays in *S. pombe* und *S. cerevisiae* verspricht eine vielfältige Anwendung zum Beispiel in der Doping-*Prescreening* Analyse. Da die Substanzen über ihre biologische Aktivität detektiert werden, kann deren chemische Struktur unbekannt sein. Dies ist vor allem zum Nachweis von im Doping missbrauchten unbekannten Designer Steroiden von Bedeutung. Die Hefeassays besitzen außerdem eine gute Kosteneffizienz. Die Kosten für einen Test mittels Hefe liegen nur bei ca. 10 % der durchschnittlichen Analysekosten einer A-Probe (WADA Report der Arbeitsgruppe für Anti-Doping Kosten, 2006). Auch können mit den Hefeassays sehr einfach große Probenumfänge untersucht werden. Die Tests werden in 96-*well* Platten durchgeführt. Bei einer Vierfachbestimmung pro Probe können bis zu 16 Urinproben und eine Positivkontrolle mit vier Konzentrationsstufen auf einer Platte analysiert werden. Weitere Vorteile der

hefebasierten Reportergensysteme sind die einfache Handhabung und die starke Robustheit der Hefezellen im Vergleich zu Wirbeltierzellkulturen. In die Hefeassays konnten unsterile, nicht vorbehandelte Urinproben eingesetzt werden. In Zellkulturen mit Wirbeltierzellen sollte jede Kontamination mit Bakterien verhindert werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Allerdings besitzen die konstruierten Hefeassays gegenüber der MS Methodik im Nachweis ein eingeschränktes Substanzspektrum. So kann nur die Aktivität anaboler Steroide und gegebenenfalls von SARMs aufgezeigt werden. Zum Doping missbrauchte Substanzen anderer Substanzklassen können nicht nachgewiesen werden.

In der Dopinganalyse könnten diese hefebasierten Biotestverfahren eine Ergänzung zur klassischen MS Analytik zum Beispiel als *Prescreening* Test darstellen. Die Hefeassays könnten dabei anzeigen, dass in den untersuchten Urinproben eine oder mehrere androgen wirksame Substanzen enthalten sind. Die genaue Identifizierung und Quantifizierung der im Urin enthaltenen Substanz bzw. Substanzgemische, die für die Überführung von Athleten notwendig ist, müsste anschließend dann mittels MS Analytik erfolgen. Somit könnten auch falsch positive Ergebnisse der Hefeassays zum Beispiel durch nachträgliche Nandrolon Neubildung im Urin durch Bakterien (Schänzer, 2010) ausgeschlossen werden.

Die Ausscheidungsversuche haben gezeigt, dass durch individuell verschiedene Konzentrationen von endogenen androgenen Substanzen in Urinproben ein Vergleich mit Sammelurin nicht immer sinnvoll ist. Besser wäre es die Athleten öfter während des Trainings zu kontrollieren und die Werte der Urinproben einer Person untereinander zu vergleichen. Plötzlich auftretende höhere Werte ließen somit die Einnahme androgener Substanzen vermuten.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der getesteten Hefeassays könnte der Nachweis von Substanzen mit antiandrogenen Eigenschaften, wie zum Beispiel endokrinen Disruptoren in Umweltproben sein. Endokrine Disruptoren stören unter anderem den Ablauf der Geschlechtsdifferenzierung (Toppari, 2008). Deshalb ist es von großem Interesse, herauszufinden, ob diese Substanzen oder Substanzgemische antiandrogene Eigenschaften aufweisen.

Andere Hefeassays werden bereits zum Nachweis von mit Steroiden verunreinigten Nahrungsergänzungsmitteln verwendet (Rijk et al., 2009). Die Eignung der konstruierten Assays für dieses Anwendungsgebiet könnte in weiteren Versuchen getestet werden. Auch könnten die Einsetzbarkeit der konstruierten Assays zum Nachweis verbotener anaboler Substanzen in der Tiermast und von Doping im Tiersport untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

Aloia, J.F., Mikhail, M., Pagan, C.D., Arunachalam, A., Yeh, J.K., Flaster, E., 1998. *Biochemical and hormonal variables in black and white women matched for age and weight.* J Lab Clin Med 132(5), 383-389.

Ayotte, C., 2010. *Detecting the administration of endogenous anabolic androgenic steroids.* Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 77-98.

Bardin, C.W., Brown, T., Isomaa, V.V., Janne, O.A., 1983. *Progestins can mimic, inhibit and potentiate the actions of androgens.* Pharmacol Ther 23, 443-459.

Beck, V., Reiter, E., Jungbauer, A., 2008. *Androgen receptor transactivation assay using green fluorescent protein as a reporter.* Anal Biochem 373, 263-271.

Begley, S., Clifton, T., 2000. *The Drug Charade.* Newsweek.

Boudreau, F., Konzak, B., 1991. *Ben Johnson and the use of steroids in sport: sociological and ethical considerations.* Can J Sport Sci 16, 88-98.

Bovee, T.F., Helsdingen, R.J., Hamers, A.R., van Duursen, M.B., Nielen, M.W., Hoogenboom, R.L., 2007. *A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonists and antagonists.* Anal Bioanal Chem 389, 1549-1558.

Bovee, T.F., Thevis, M., Hamers, A.R., Peijnenburg, A.A., Nielen, M.W., Schoonen, W.G., 2010. *SERMs and SARMs: detection of their activities with yeast based bioassays.* J Steroid Biochem Mol Biol 118, 85-92.

Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Giannetti, L., Merolle, M., Neri, B., A, T., 2005. *Detection of boldenone and its major metabolites by liquid chromatography—tandem mass spectrometry in urine samples.* Analytica Chimica Acta 552, 116-126.

Büttner, A., Thieme, D., 2010. *Pathological findings and structure-activity relationships.* In: Thieme, D., Hemmersbach, P. (Eds.) Doping in Sports, Handbook of experimental pharmacology, vol. 195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 459-484.

Campbell, N.A., 1998. *Biologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Cormack, B., 1998. *Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi.* Curr Opin Microbiol 1, 406-410.

Cresnar, B., Zakelj-Mavric, M., 2009. *Aspects of the steroid response in fungi.* Chemico-Biological Interactions 178, 303-309.

Dalton, J.T., Mukherjee, A., Zhu, Z., Kirkovsky, L., Miller, D.D., 1998. *Discovery of nonsteroidal androgens.* Biochem Biophys Res Commun 244, 1-4.

- Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G.P., Barrack, E.R., 2005.** *Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action.* Prostate 62, 133-139.
- Drobna, E., Bialkova, A., Subik, J., 2008.** *Transcriptional regulators of seven yeast species: comparative genome analysis - Review.* Folia Microbiol 53(4), 275-287.
- Duggan, E.P., 2004.** *The Marathon From Hell.* Marathon and beyond.
- Edwards, D.P., Altmann, M., DeMarzo, A., Zhang, Y., Weigel, N.L., Beck, C.A., 1995.** *Progesterone receptor and the mechanism of action of progesterone antagonists.* J Steroid Biochem Mol Biol 53(1-6), 449-458.
- Eldridge, M.L., Sanseverino, J., Layton, A.C., Easter, J.P., Schultz, T.W., Sayler, G.S., 2007.** *Saccharomyces cerevisiae BLYAS, a new bioluminescent bioreporter for detection of androgenic compounds.* Appl Environ Microbiol 73, 6012-6018.
- Enmark, E., Gustafsson, J.A., 1999.** *Oestrogen receptors - an overview.* J Intern Med 246, 133-138.
- EPA, 1998.** Endocrine disruptor screening and testing advisory committee, Final report, Washington.
- Ernst, R., Klemm, R., Schmitt, L., Kuchler, K., 2005.** *Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps.* Methods Enzymol 400, 460-484.
- Feiden, K., Blasius, H., 2008.** *Doping im Sport. Wer-Womit-Warum.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Feige, A., Rempen, A., Würfel, W., Jawny, J., Rohde, A., 2006.** *Frauenheilkunde. Fortpflanzungsmedizin Geburtsmedizin Onkologie Psychosomatik.* Urban und Fischer Verlag.
- Foss, G., Simpson, S., 1959.** *Oral methyltestosterone and jaundice.* Br Med J 1, 259-263.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, C.J., McDonnell, D.P., 1997.** *Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay.* Toxicol Appl Pharmacol 143, 205-212.
- Gao, W., Bohl, C.E., Dalton, J.T., 2005.** *Chemistry and structural biology of androgen receptor.* Chem Rev 105, 3352-3370.
- Gester, S., Metz, P., Zierau, O., Vollmer, G., 2001.** *An efficient synthesis of the potent phytoestrogens 8-prenylnaringenin and 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin by europium(III)-catalyzed Claisen rearrangement.* Tetrahedron 57, 1015-1018.
- Gietz, R.D., Woods, R.A., 2002.** *Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method.* Methods Enzymol 350, 87-96.
- Gryglik, D., Olak, M., Miller, J.S., 2010.** *Photodegradation kinetics of androgenic steroids boldenonenext term and trenbolone in aqueous solutions* Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 212, 14-19.

Hahn, T., Tag, K., Riedel, K., Uhlig, S., Baronian, K., Gellissen, G., Kunze, G., 2006. *A novel estrogen sensor based on recombinant *Arxula adeninivorans* cells.* Biosens Bioelectron 21, 2078-2085.

Hebestreit, M., Flenker, U., Fußhöller, G., Geyer, H., Güntner, U., Mareck, U., Piper, T., Thevis, M., Ayotte, C., Schänzer, W., 2006. *Determination of the origin of urinary norandrosterone traces by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry* Analyst 131, 1021-1026.

Ho, E.N.M., Leung, D.K.K., Leung, G.N.W., Wan, T.S.M., Wong, H.N.C., Xu, X., Yeung, J.H.K., 2007. *Metabolic studies of mesterolone next term in horses* Analytica Chimica Acta 596, 149-155.

Houghton, E., Maynard, S., 2010. *Some aspects of Doping and medication control in equine sports.* In: Thieme, D., Hemmersbach, P. (Eds.) Doping in Sports, Handbook of experimental pharmacology, vol. 195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 369-409.

Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln, 2009. *Jahresstatistik 2009 Köln nach den Ergebnissen des WADA-akkreditierten Laboratoriums* http://www.dshs-koeln.de/y/biochemie/rubriken/07_info/stat_09.pdf

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A., 1983. *Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.* J Bacteriol 153, 163-168.

Jiao, B., Yeung, E.K., Chan, C.B., Cheng, C.H., 2008. *Establishment of a transgenic yeast screening system for estrogenicity and identification of the anti-estrogenic activity of malachite green.* J Cell Biochem 105, 1399-1409.

Jimenez, C., de la Torre, R., Segura, J., Ventura, R., 2006. *Stability studies of testosterone and epitestosterone glucuronides in urine.* Rapid Commun Mass Spectrom 20, 858-864.

Johnson, M.H., 2007. *Essential reproduction.* Blackwell Publishing, Massachusetts, Oxford, Victoria.

Kazlauskas, R., 2010. *Designer steroids.* In: Thieme, D., Hemmersbach, P. (Eds.) Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 155-185.

Kemppainen, J.A., Wilson, E.M., 1996. *Agonist and antagonist activities of hydroxyflutamide and casodex relate to androgen receptor stabilization.* Urology 48(1), 157-163.

Kicman, A.T., 2010. *Biochemical and physiological aspects of endogenous androgens.* In: Thieme, D., Hammersbach, P. (Eds.) Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 25-64.

Kjeld, J.M., Wieland, J.M., Puah, M., 1980. *Progesterone is conjugated in human urine.* Clin Chim Acta 102, 119-126.

- Klement, T., Dankmeyer, L., Hommes, R., van Solingen, P., Büchs, J., 2011.** *Acetate-glycerol cometabolism: Cultivating Schizosaccharomyces pombe on a non-fermentable carbon source in a defined minimal medium.* Journal of Bioscience and Bioengineering.
- Kloas, W., 2002.** *Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors.* Int Rev Cytol 216, 1-57.
- Kloas, W., Lutz, I., 2006.** *Amphibians as model to study endocrine disruptors.* J Chromatogr A 1130, 16-27.
- Knippers, R., 2001.** *Molekulare Genetik.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- Kolle, S.N., Kamp, H.G., Huener, H.A., Knickel, J., Verlohner, A., Woitkowiak, C., Landsiedel, R., van Ravenzwaay, B., 2010.** *In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays.* Toxicol In Vitro 24, 2030-2040.
- Lange, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P., 2001.** *Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (pimephales promelas).* Environmental Toxicology and Chemistry 20, 1216–1227.
- Lazar, M.A., 2002.** *Mechanism of action of hormones that act on nuclear receptors.* Williams textbook of endocrinology. W. B. Sanders Company, Philadelphia, pp. 35-44.
- Leskinen, P., Michelini, E., Picard, D., Karp, M., Virta, M., 2005.** *Bioluminescent yeast assay for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices.* Chemosphere 61(2), 259-266.
- Levin, D.E., 2005.** *Cell wall integrity signalling in Saccharomyces cerevisiae.* Microbiol Mol Biol Rev 69(2), 262-291.
- Li, J., Li, N., Ma, M., Giesy, J.P., Wang, Z., 2008.** *In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides.* Toxicol Lett 183(1-3), 65-71.
- Luisi, M., Fassorra, C., 1972.** *The effect of mesterolone upon the concentration of testosterone in rat testis.* Journal of Steroid Biochemistry 3, 721-724.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995.** *The nuclear receptor superfamily: the second decade.* Cell 83, 835-839.
- Maser, E., Xiong, G., 2010.** *The Comamonas testosteroni steroid biosensor system (COSS)--reflection on other methods.* J Steroid Biochem Mol Biol 121, 633-640.
- Michelini, E., Leskinen, P., Virta, M., Karp, M., Roda, A., 2005.** *A new recombinant cell-based bioluminescent assay for sensitive androgen-like compound detection.* Biosens Bioelectron 20, 2261-2267.

- Milligan, S.R., Kalita, J.R., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., De Keukeleire, D., 1999.** *Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer.* J Clin Endocrinol Metab 84(6), 2249-2252.
- Mohler, M.L., Nair, V.A., J., H.D., Rakov, I.M., Patil, R., Miller, D.D., 2005.** *Nonsteroidal tissue selective androgen modulators: a promising class of clinical candidates* Expert Opinion on Therapeutic Patents 15, 1565-1585.
- Moreno, M.B., Duran, A., Ribas, J.C., 2000.** *A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast.* Yeast 16, 861-872.
- Morsink, L.F.J., Vogelzangs, N., Nicklas, B.J., Beekman, A.T.F., Satterfield, S., Rubin, S.M., Yaffe, K., Simonsick, E., Newman, A.B., Kritchevsky, S.B., Penninx, B.W.J.H., 2007.** *Associations between sex steroid hormone levels and depressive symptoms in elderly men and women: results from the health ABC study.* Psychoneuroendocrinology 32, 874-883.
- Mouritsen, A., Aksglaede, L., Sorensen, K., Mogensen, S.S., Leffers, H., Main, K.M., Frederiksen, H., Andersson, A.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., 2007.** *Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty.* Int J Androl 33, 346-359.
- Mülhardt, C., 2003.** *Molekularbiologie / Genomics.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Müller, R.K., 2010.** *History of Doping and Doping Control.* In: Thieme, D., Hemmersbach, P. (Eds.) Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-23.
- Müller, W.A., Hassel, M., 2002.** *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tier.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Mumberg, D., Müller, R., Funk, M., 1995.** *Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds.* Gene 156, 119-122.
- Munk, K., 2002.** *Grundstudium Biologie, Zoologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Nelson, D., Cox, M., 2001.** *Lehninger Biochemie.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Parenteau, J., Klinck, R., Good, L., Langel, U., Wellinger, R.J., Elela, S.A., 2005.** *Free uptake of cell-penetrating peptides by fission yeast.* FEBS Lett 579, 4873-4878.
- Parr, M.K., Geyer, H., Gütschow, M., Haenelt, N., Opfermann, G., Thevis, M., Schänzer, W., 2008.** *New steroids on the "supplement" market.* In: Schänzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A., Mareck, U. (Eds.) Recent advances in doping analysis (16). Sportverlag Strauß, Köln, pp. 73-82.
- Parr, M.K., Opfermann, G., Geyer, H., Westphal, F., Sonnichsen, F.D., Zapp, J., Kwiatkowska, D., Schanzer, W., 2011.** *Seized designer supplement named "1-Androsterone": Identification as 3beta-hydroxy-5alpha-androst-1-en-17-one and its urinary elimination.* Steroids, doi:10.1016/j.steroids.2011.02.001.

Patricot, M.C., Mathian, B., Serpentie, S., Revol, A., 1986. *Determination of urinary estradiol using an enzymatic method during the menstrual cycle. Comparison with an method using isotope dilution-mass spectrometry (ID-MS).* Clin Chim Acta 158, 139-145.

Perez, P., Ribas, J.C., 2004. *Cell wall analysis.* Methods 33, 245-251.

Prasad, R., Devaux, F., Dhamgaye, S., Banerjee, D., 2010. *Response of pathogenic and non-pathogenic yeasts to steroids.* Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.

Rijk, J.C., Bovee, T.F., Wang, S., Van Poucke, C., Van Peteghem, C., Nielen, M.W., 2009. *Detection of anabolic steroids in dietary supplements: the added value of an androgen yeast bioassay in parallel with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method.* Anal Chim Acta 637, 305-314.

Roelens, F., Heldring, N., Dhooge, W., Bengtsson, M., Comhaire, F., Gustafsson, J.A., Treuter, E., De Keukeleire, D., 2006. *Subtile side-chain modifications of the hop phytoestrogen 8-prenylnaringenin result in distinct agonist/antagonist activity.* J Med Chem 49(25), 7357-7365.

Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1995. *Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen.* Environmental Toxicology and Chemistry 15, 241-248.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1998. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanseverino, J., Gupta, R.K., Layton, A.C., Patterson, S.S., Ripp, S.A., Saidak, L., Simpson, M.L., Schultz, T.W., Sayler, G.S., 2005. *Use of Saccharomyces cerevisiae BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds.* Appl Environ Microbiol 71, 4455-4460.

Scarth, J.P., Clarke, A.D., Teale, P., Pearce, C.M., 2010. *Comparative in vitro metabolism of the 'designer' steroid estra-4,9-diene-3,17-dione between the equine, canine and human: identification of target metabolites for use in sports doping control.* Steroids 75, 643-652.

Schänzer, W., 2010. *Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln* (<http://www.dshs-koeln.de/y/biochemie/index.html>, Zugriff Januar 2011).

Schellhammer, P.F., Sharifi, R., Block, N.L., Soloway, M.S., Venner, P.M., Patterson, A.L., Sarosdy, M.F., Vogelzang, N.J., Schellenger, J.J., Kolvenbag, G.J., 1997. *Clinical benefits of bicalutamide compared with flutamide in combined androgen blockade for patients with advanced prostatic carcinoma: final report of a double-blind, randomized, multicenter trial.* Casodex Combination Study Group. Urology 50, 330-336.

Schiestl, R.H., Gietz, R.D., 1989. *High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.* Curr Genet 16, 339-346.

Segaloff, A., Horwitt, B.N., Carabasi, R.A., Murison, P.J., Schlosser, J.V., 1953. *Hormonal therapy in cancer of the breast. V. The effect of methyltestosterone on clinical course and hormonal excretion.* Cancer 6, 483-487.

Seyfert, W., 1998. *Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.

Sipiczki, M., 2000. *Where does fission yeast sit on the tree of life?* Genome Biol 1, REVIEWS1011.

Sohoni, P., Sumpter, J.P., 1998. *Several environmental oestrogens are also anti-androgens.* J Endocrinol 158, 327-339.

Stephany, R.W., 2010. *Hormonal Growth Promoting Agents in Food Producing Animals*. In: Thieme, D., Hemmersbach, P. (Eds.) *Doping in Sports, Handbook of experimental pharmacology* vol. 195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 355-167.

Striegel, H., Simon, P., Frisch, S., Roecker, K., Dietz, K., Dickhuth, H.H., Ulrich, R., 2006. *Anabolic ergogenic substance users in fitness-sports: a distinct group supported by the health care system.* Drug Alcohol Depend 81, 11-19.

Stryer, L., 1999. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Sullivan, D.P., Georgiev, A., Menon, A.K., 2009. *Tritium suicide selection identifies proteins involved in the uptake and intracellular transport of sterols in Saccharomyces cerevisiae.* Eukaryot Cell 8, 161-169.

Swiglo, B.A., Cosma, M., Flynn, D.N., Kurtz, D.M., Labella, M.L., Mullan, R.J., Erwin, P.J., Montori, V.M., 2008. *Clinical review: Antiandrogens for the treatment of hirsutism: a systematic review and metaanalyses of randomized controlled trials.* J Clin Endocrinol Metab 93, 1153-1160.

Thevis, M., Kamber, M., Schanzer, W., 2006. *Screening for metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes.* Rapid Commun Mass Spectrom 20, 870-876.

Thevis, M., Schänzer, W., 2009. *Dopingmittel der Zukunft und deren Nachweis. Selektive Androgenrezeptor Modulatoren (SARMs) und HIF-Stabilisatoren.* FIT Das Wissenschaftsmagazin (1), pp. 14-17.

Thevis, M., Schänzer, W., 2010. *Synthetic anabolic agents: steroids and nonsteroidal selective androgen receptor modulators.* In: Thieme, D., Hemmersbach, P. (Eds.) *Doping in Sports, Handbook of experimental pharmacology*, vol. 195. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 99-126.

Thongboonkerd, V., Saetun, P., 2007. *Bacterial overgrowth affects urinary proteome analysis: recommendation for centrifugation, temperature, duration, and the use of preservatives during sample collection.* J Proteome Res 6, 4173-4181.

Tokalov, S.V., Henker, Y., Schwab, P., Metz, P., Gutzeit, H.O., 2004. *Toxicity and cell cycle effects of synthetic 8-phrenylnaringenin and derivatives in human cells.* Pharmacology 71(1), 46-56.

Toppari, J., 2008. *Environmental endocrine disrupters.* Sex Dev 2, 260-267.

Venturelli, E., Cavalleri, A., Secreto, G., 1995. *Methods for urinary testosterone analysis.* J Chromatogr B Biomed Appl 671, 363-380.

WADA, 2009. *Laboratory statistics Report 2009* (http://www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Anti-Doping_Laboratories/Lab_Statistics/WADA_2009_LaboratoryStatisticsReport_Final.pdf | Zugriff Dezember 2010).

Waring, R.H., Harris, R.M., 2005. *Endocrine disruptors: a human risk?* Mol Cell Endocrinol 244, 2-9.

Westaby, D., Ogle, S.J., Paradinas, F.J., Randell, J.B., Murray-Lyon, I.M., 1977. *Liver damage from long-term methyltestosterone.* Lancet 2, 262-263.

Wirth, M.P., Hakenberg, O.W., Froehner, M., 2007. *Antiandrogens in the treatment of prostate cancer.* Eur Urol 51, 306-313; discussion 314.

Wolf, S., Diel, P., Parr, M.K., Rataj, F., Schänzer, W., Vollmer, G., Zierau, O., 2010. *Long-term detection of methyltestosterone (ab-) use by a yeast transactivation system.* Arch Toxicol.

Yeh, S., Miyamoto, H., Shima, H., Chang, C., 1998. *From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate.* Proc Natl Acad Sci U S A 95, 5527-5532.

Yoo, E.J., Jang, Y.K., Kimm, H.S., Choi, E.S., Park, S.D., 2002. *Development of a new xenoestrogen screening system using fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.* Mol Cells 13, 148-153.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. *A greedy algorithm for aligning DNA sequences.* Journal of Computational Biology 7 (1-2) 203-214.

Zierau, O., Morrissey, C., Watson, R.W., Schwab, P., Kolba, S., Metz, P., Vollmer, G., 2003. *Antiandrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin.* Planta Med 69, 856-858.

Zierau, O., Kretschmar, G., Möller, F., Weigt, C., Vollmer, G., 2008. *Time dependency of uterine effects of naringenin type phytoestrogens in vivo.* Mol Cell Endocrinol 294, 92-99.

7 Anhang

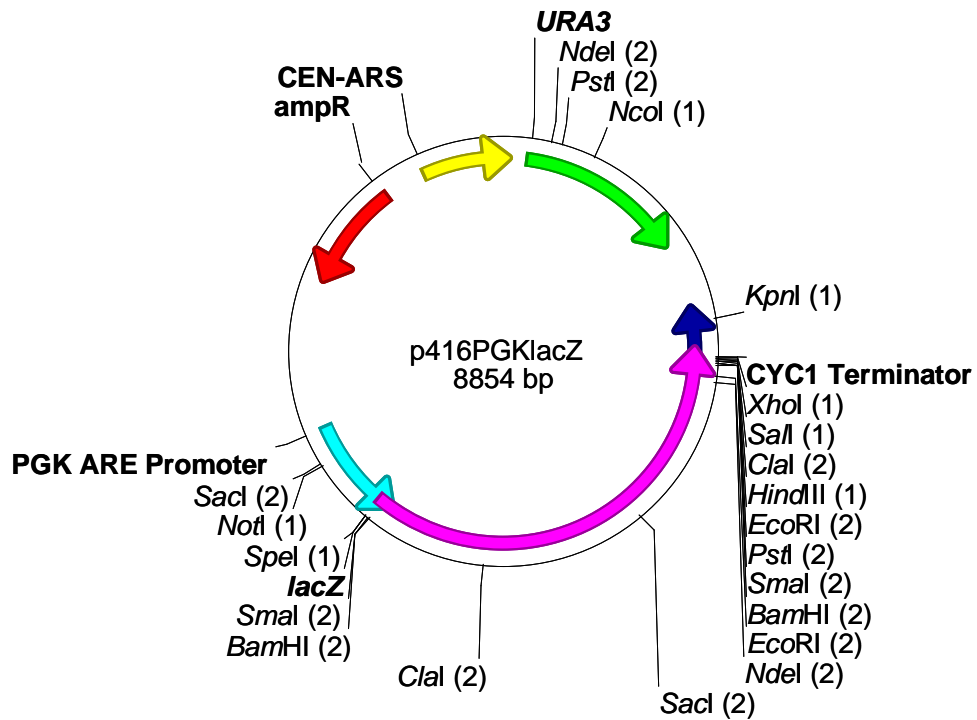


Abbildung 7.1 Plasmidkarte von p416PGKlacZ

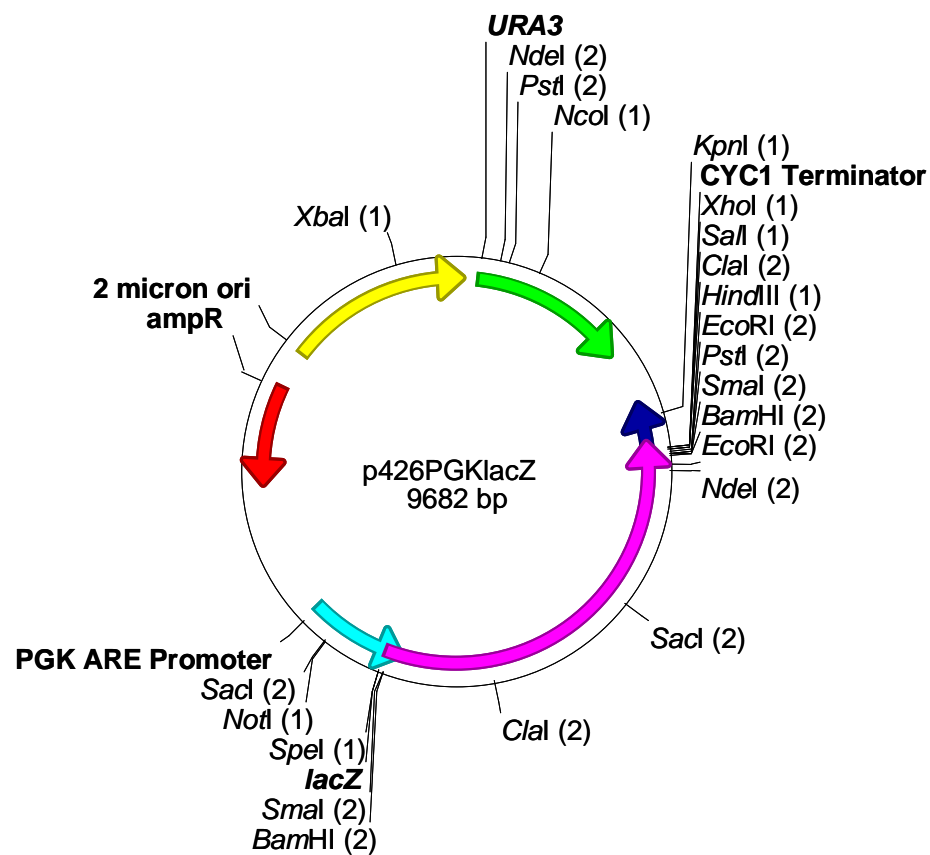


Abbildung 7.2 Plasmidkarte von p426PGKlacZ

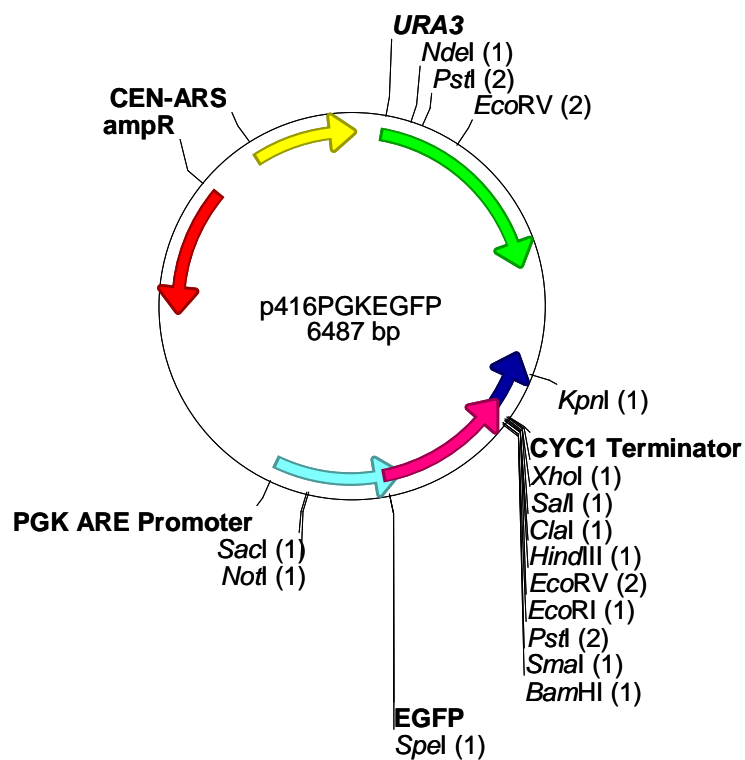


Abbildung 7.3 Plasmidkarte von p416PGKEGFP

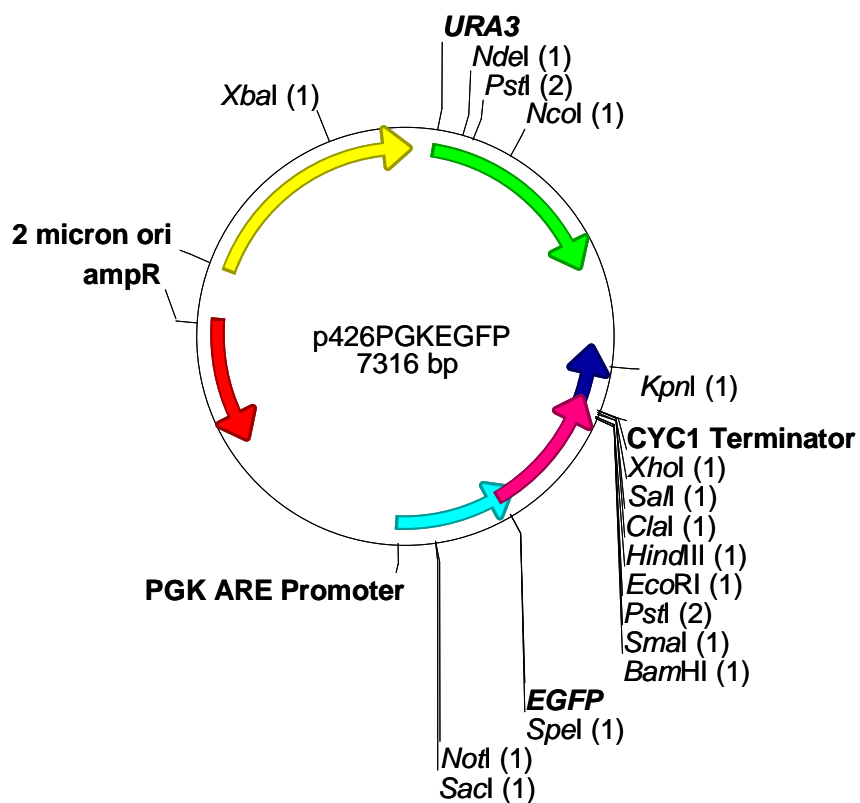


Abbildung 7.4 Plasmidkarte von p426PGKEGFP

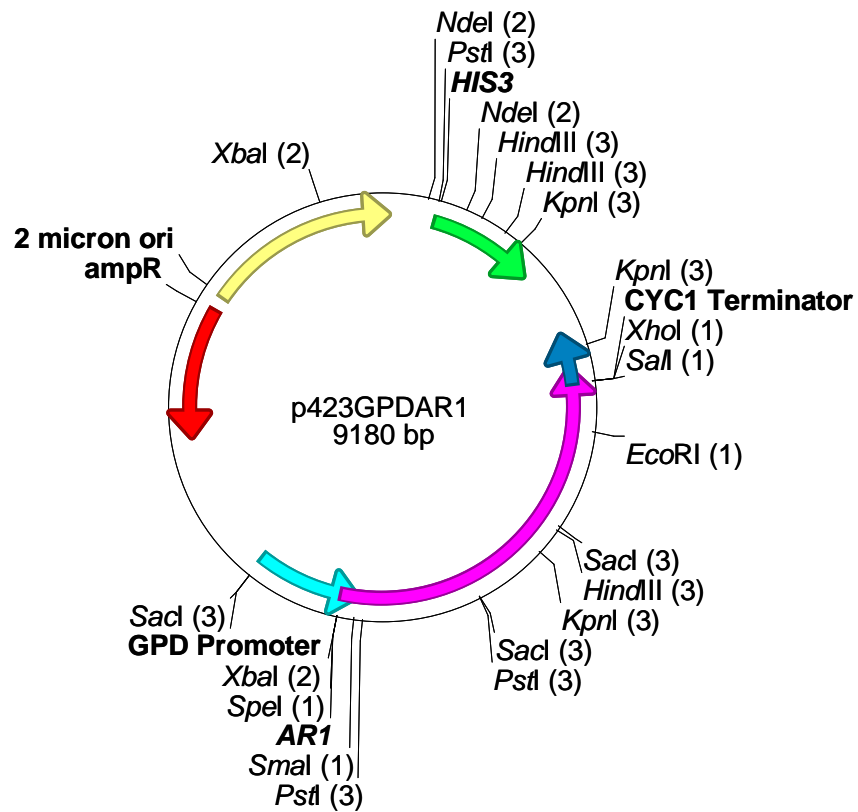


Abbildung 7.5 Plasmidkarte von p423GPDAR1

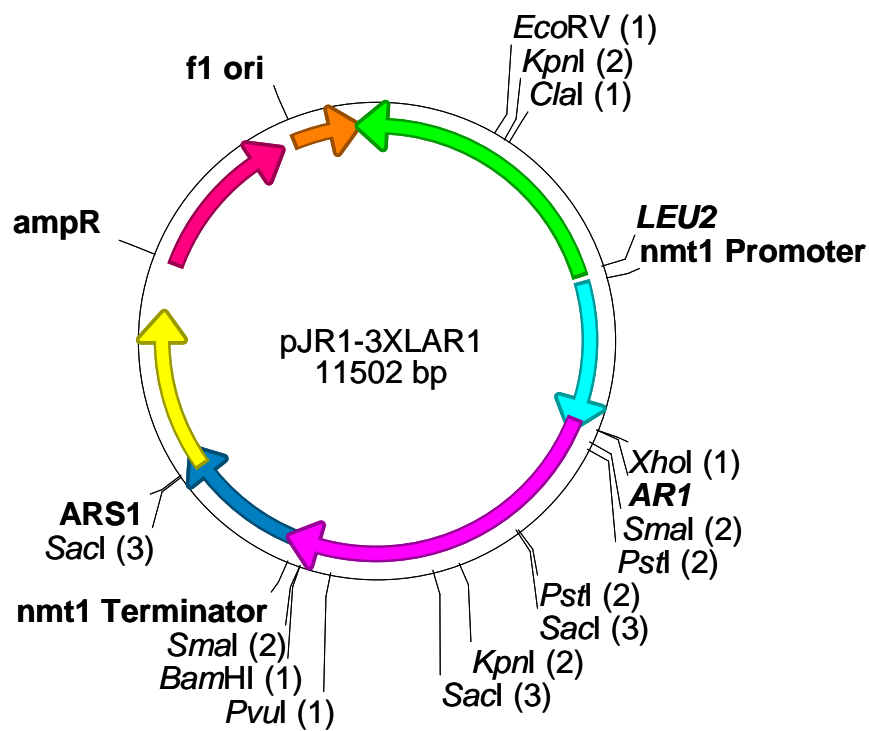


Abbildung 7.6 Plasmidkarte von pJR1-3XLAR1

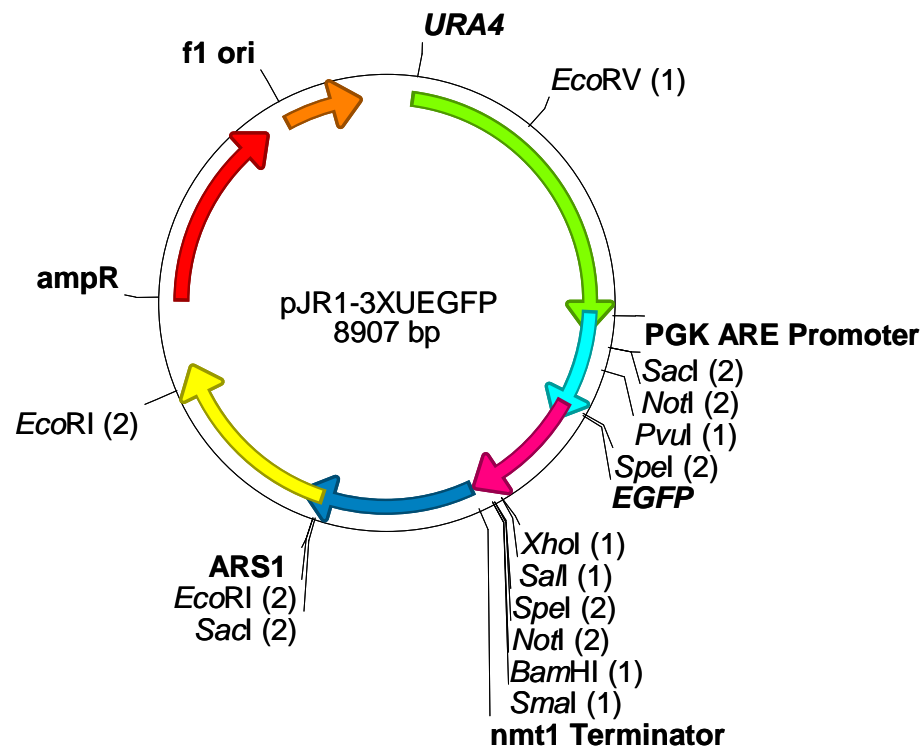


Abbildung 7.7 Plasmidkarte von pJR1-3XUEGFP